

## 明細書

## G－C S Fを含む線維芽細胞動員剤及び創傷治療剤

技術分野

- 5      本発明は、顆粒球コロニー刺激因子（G－C S F）を有効成分として含む線維芽細胞動員剤に関する。また、本発明は、G－C S Fを有効成分として含む線維芽細胞の生着剤に関する。さらに、本発明は、G－C S Fを有効成分として含む創傷治療剤に関する。

10    背景技術

- ヒトG－C S Fは顆粒球系造血幹細胞の分化誘導因子として発見された造血因子であり、生体内では好中球造血を促進することから、骨髄移植や癌化学療法後の好中球減少症治療剤として臨床応用されている。また、上記作用のほかにも、ヒトG－C S Fには、幹細胞に作用してその分化増殖を刺激する作用や骨髄中の
- 15    幹細胞を末梢血中に動員する作用がある。実際に後者の作用に基づいて、臨床の現場では強力な化学療法を施行した後の癌患者の造血回復促進を目的として、ヒトG－C S Fにより動員された末梢血造血幹細胞を移植する末梢血幹細胞移植術が行われている。

20    発明の開示

本発明は、線維芽細胞を移植することなく、簡便に線維芽細胞を創傷組織に動員し、線維芽細胞を創傷組織に生着させ、そして創傷を治療することを目的とする。

- 本発明者らは、心筋梗塞後の創傷組織の再生について検討を行った。その結果、
- 25    G－C S Fを投与することにより、心筋梗塞巣に線維芽細胞が移動し、心機能の低下が防止され、心臓のリモデリングを改善することを見出した。本発明はこの知見に基づき完成したものである。

すなわち、本発明は、顆粒球コロニー刺激因子（G－C S F）を有効成分として含む線維芽細胞動員剤を提供するものである。

また、本発明は、G-C S Fを有効成分として含む、心疾患発症後の心臓における線維芽細胞の生着剤を提供するものである。

また、本発明は、G-C S Fを有効成分として含む創傷治療剤を提供するものである。

5      さらに、本発明は、有効量のG-C S Fを投与することを含む、線維芽細胞動員方法を提供する。

また、本発明は、有効量のG-C S Fを投与することを含む、線維芽細胞を心疾患発症後の心臓に生着させるための方法を提供するものである。

10      また、本発明は、有効量のG-C S Fを投与することを含む、創傷治療方法を提供するものである。

心筋梗塞後にG-C S Fを投与することにより、梗塞巣に骨髓細胞由来の心筋細胞が多数観察された。一方、その10倍近い数の線維芽細胞も観察された。すなわち、G-C S F投与により骨髓から種々の幹細胞由来の細胞が梗塞巣に遊走し、梗塞巣が再生され、心筋梗塞後のリモデリングを防止したことが明らかとなった。G-C S F投与により、急性期に白血球が多数浸潤するだけでなく、慢性期（梗塞後60日）に線維芽細胞が梗塞巣に移動することが創傷治癒を促進し、リモデリングを改善したと考えられる。心筋梗塞後の梗塞巣に線維芽細胞を移植することで梗塞巣のリモデリングが防止できたことが報告されている（Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD, Taylor DA, Transplant. 9, 2000, 359-368）。本発明においては、心筋梗塞後にG-C S Fを投与することにより、骨髓から線維芽細胞を遊走させることができる。したがって、線維芽細胞を移植することなく梗塞巣のリモデリングを防止することが可能であり、臨床応用上極めて有利である。

25      また、この事実は心筋梗塞以外でも、外傷等の種々の創傷治癒過程においてG-C S Fを臨床応用することが出来ることを意味する。すなわち、創傷治癒過程においてG-C S Fを投与することにより、早期の顆粒球浸潤だけでなく線維芽細胞も供給され、創傷治癒を加速し、さらにより強固な治癒組織を作ることが可能である。これまで、創傷治癒時にG-C S Fを投与すると、顆粒球を大量に浸潤させることとなり、組織破壊に繋がると考えられていたが（Romson, JL, Hook

BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR, Circulation 67(5), 1983, 1016-1023)、本発明においては、G-C S Fを投与することでより強固な創傷部位の治癒が可能である。

## 5 図面の簡単な説明

図1は、骨髓移植60日後の末梢血有核細胞についてFACS解析を行った結果を示す図である。

図2は、骨髓のサイトスピン標本の共焦点レーザー顕微鏡写真である。緑色はGFP陽性の骨髓由来細胞であることを示し、青色はDAPI染色により有核細胞であることを示す。

図3は、心筋梗塞作製後、G-C S Fを10日間皮下投与したマウス（G-C S F投与群）、及び生理食塩水を投与したマウス（対照群）についての生存率を示した図である。

図4は、心筋梗塞作製後60日での経胸壁心エコーMモード画像である。上から、正常マウス、対照マウス及びG-C S F投与（ $100\mu\text{g}/\text{kg}$ ）マウスの左室を示す。

図5は、心筋梗塞作製後60日における、左室駆出率に対するG-C S F投与の効果を示すグラフである。左から、正常群、G-C S F投与群（ $100\mu\text{g}/\text{kg}$ ）及びG-C S F投与群（ $300\mu\text{g}/\text{kg}$ ）の結果を示す。

図6は、心筋梗塞作製後60日における、左室拡張末期径に対するG-C S F投与の効果を示すグラフである。左から、正常群、G-C S F投与群（ $100\mu\text{g}/\text{kg}$ ）及びG-C S F投与群（ $300\mu\text{g}/\text{kg}$ ）の結果を示す。

図7（a）は、心筋梗塞作製後60日における対照群（左図）及びG-C S F投与群（右図）の心臓左心室短軸断面についてのアザン染色図である。赤色部分が筋線維、青色部分が膠原線維を示す。

図7（b）は、心筋梗塞作製後60日におけるG-C S F投与群の心臓左心室短軸断面についてのアザン染色図（左図）及び共焦点レーザー顕微鏡写真（右図）である。

図8は、心筋梗塞巣の共焦点レーザー顕微鏡写真である。（a）は非梗塞巣、

(b)は対照群における心筋梗塞巣、(c)はG-C S F投与群(100  $\mu$ g/kg)の心筋梗塞巣を示す。(d)はLac-ZトランスジェニックマウスにG-C S Fを投与(100  $\mu$ g/kg)した場合の心筋梗塞巣を示す。

図9は、心筋梗塞巣に存在するG F P陽性細胞数を示すグラフである。

5 図10は、心筋梗塞巣を、抗 $\alpha$ -平滑筋アクチン抗体を用いて免疫染色したときの共焦点レーザー顕微鏡写真である。緑色はG F P陽性細胞、青色はD A P Iにより染色された核、赤色は $\alpha$ -平滑筋アクチンを示す。

図11は、心筋梗塞巣を、抗フォンビルブランド因子(v W F)抗体を用いて免疫染色したときの共焦点レーザー顕微鏡写真である。緑色はG F P陽性細胞、  
10 青色はD A P Iにより染色された核、赤色はv W Fを示す。

図12は、心筋梗塞巣を、抗アクチニン抗体を用いて免疫染色したときの顕微鏡写真である。緑色はG F P陽性細胞、青色はD A P Iにより染色された核、赤色はアクチニンを示す。

図13は、心筋梗塞巣を、抗アクチニン抗体を用いて免疫染色したときの顕微  
15 鏡写真である。緑色はG F P陽性細胞、青色はD A P Iにより染色された核、赤色はアクチニンを示す。

図14は、心筋梗塞巣を1  $\mu$ mごとにスライスした切片について、抗アクチニン抗体を用いて免疫染色したときの顕微鏡写真である。緑色はG F P陽性細胞、青色はD A P Iにより染色された核、赤色はアクチニンを示す。

20 図15は、G-C S F投与後の心筋梗塞巣におけるG F P陽性細胞の種類別の割合を示すグラフである。

図16は、全骨髄移植群及び単一造血幹細胞移植群における末梢血有核細胞数に対するG-C S F投与の効果を示すグラフである。

図17は、心筋梗塞作製後の生存率に対するG-C S F投与の効果を示す図である。図中、点線は全骨髄移植群、直線は単一造血幹細胞移植群を示し、四角は  
25 G-C S F投与群(+), 丸はG-C S F非投与群(-)を示す。

図18は、単一造血幹細胞移植群における心筋梗塞巣を抗ビメンチン抗体で免疫染色したときの共焦点レーザー顕微鏡写真である。緑色はG F P陽性細胞、青色はD A P Iにより染色された核、赤色はビメンチンを示す。



図 1 9 は、全骨髄移植群及び単一造血幹細胞移植群における G F P 陽性細胞数に対する G - C S F 投与の効果を示すグラフである。

図 2 0 は、単一造血幹細胞移植群に G - C S F 投与した場合の心筋梗塞境界領域について抗アクチニン抗体を用いて免疫染色したときの共焦点レーザー顕微鏡写真である。緑色は G F P 陽性細胞、青色は D A P I により染色された核、赤色はアクチニンを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明は、G - C S F を有効成分として含む線維芽細胞動員剤に関するものである。線維芽細胞が動員される場所は特に制限されない。例えば、創傷を負った組織が存在する場合、G - C S F を投与することにより、創傷を負った組織に線維芽細胞を動員することが可能である。

本発明において創傷とは、体組織の障害・損傷のことをいい、例えば、心臓、肺、腎臓、腸、肝臓、腱などの内部組織や臓器への障害・損傷や、皮膚などへの外傷を含む。創傷を負った組織の具体的な例としては、心筋梗塞後の心臓を好適に挙げることができる。

線維芽細胞は、通常、結合組織の固有細胞であり、粗面小胞体とゴルジ装置の良好な発育を特徴とする楕円形の核と紡錘状の原形質を持つ細胞である。又、多くの臓器に存在する間葉系細胞で実質細胞を埋める役をする細胞も含まれる。線維芽細胞は通常、体内の間質物質（コラーゲン、フィブロネクチン、ムコ多糖など）を多量産生する能力を有する。創傷を負った組織に線維芽細胞を動員することにより、創傷の治癒を促進することが可能である。

又、本発明は G - C S F を有効成分として含む、心疾患発症後の心臓における線維芽細胞生着剤に関する。

心疾患の具体的な例としては、例えば、虚血性心疾患（心筋梗塞など）や心筋疾患（心筋症など）などを挙げることができる。例えば、心筋梗塞後に G - C S F を投与することにより、心筋梗塞巣へ線維芽細胞を生着させることが可能である。

さらに、本発明は G - C S F を有効成分として含む創傷治療剤に関するもので

ある。

本発明に用いるG-C S Fは、どのようなG-C S Fでも用いることができるが、好ましくは高度に精製されたG-C S Fであり、より具体的には、哺乳動物G-C S F、特にヒトG-C S Fと実質的に同じ生物学的活性を有するものである。G-C S Fの由来は特に限定されず、天然由来のG-C S F、遺伝子組換え法により得られたG-C S Fなどを用いることができるが、好ましくは遺伝子組換え法により得られたG-C S Fである。遺伝子組換え法により得られるG-C S Fには、天然由来のG-C S Fとアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列中の1または複数のアミノ酸を欠失、置換、付加等したもので、天然由来のG-C S Fと同様の生物学的活性を有するもの等であってもよい。アミノ酸の欠失、置換、付加などは当業者に公知の方法により行うことが可能である。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275 ; Zoller, M.J. and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500 ; Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456 ; Kramer, W. and Fritz, H.J. (1987) Methods Enzymol. 154, 350-367 ; Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 488-492 ; Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766) などを用いて、G-C S Fのアミノ酸に適宜変異を導入することにより、G-C S Fと機能的に同等なポリペプチドを調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。一般的に、置換されるアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に置換されることが好ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H、F、Y、W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一文字表記を表す)。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポ

リペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666 ; Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500 ; Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433 ; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

また、本発明においては、G-C S Fはタンパク質として投与してよいが、遺伝子治療のようにG-C S Fをコードする遺伝子を投与してもよい。G-C S Fをコードする遺伝子は、通常、発現カセットを含む発現ベクター等として投与されるのが一般的である。ベクターは特に限定されず、非ウイルスベクターを用いてもよいし、ウイルスベクターを用いてもよい (別冊実験医学、「遺伝子導入と発現解析実験方法」、羊土社、1996など)。ベクターの例としては、プラスミドベクター、ウイルスベクター、ファージベクター、コスミドベクター、YACベクターなどを挙げるができる。発現ベクターには、通常、プロモーター等の調節因子などが含まれる。遺伝子の導入方法はどのような方法を用いてもよく、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、リポソーム法を用いた導入方法、naked-DNA法、レセプター介在性遺伝子導入方法、遺伝子銃を用いた方法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いた方法などを用いることが可能である。また、本発明においては、遺伝子を直接体内に導入してもよいし、取り出した細胞や培養して得た細胞などに遺伝子を導入した後に該細胞を体内に戻してもよい。

又、G-C S Fと他のタンパク質との融合タンパク質を用いることも可能である。融合ポリペプチドを作製するには、例えば、G-C S FをコードするDNAと他のタンパク質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよい。本発明のG-C S Fとの融合に付される他のタンパク質としては、特に限定されない。

又、化学修飾したG-C S Fを用いることも可能である。化学修飾したG-C S Fの例としては、例えば、糖鎖の構造変換・付加・欠失操作を行ったG-C S Fや、ポリエチレングリコール・ビタミンB12等、無機あるいは有機化合物等の化合物を結合させたG-C S Fなどを挙げるができる。

本発明で用いるG-CSFは、いかなる方法で製造されたものでもよく、例えば、ヒト腫瘍細胞やヒトG-CSF産生ハイブリドーマの細胞株を培養し、これから種々の方法で抽出し分離精製したG-CSF、あるいは遺伝子工学的手法により大腸菌、イースト菌、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、C1  
5 27細胞、COS細胞、ミエローマ細胞、BHK細胞、昆虫細胞、などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したG-CSFなどを用いることができる。本発明において用いられるG-CSFは、遺伝子工学的手法により製造されたG-CSFが好ましく、哺乳動物細胞（特にCHO細胞）を用いて製造されたG-CSFが好ましい（例えば、特公平1-44200号公報、特公平2-5395  
10 号公報、特開昭62-129298号公報、特開昭62-132899号公報、特開昭62-236488号公報、特開昭64-85098号公報）。

本発明の線維芽細胞動員剤等には、その投与方法や剤形に応じて必要により、懸濁化剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、界面活性化剤、希釈剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤  
15 等を適宜添加することができる。

懸濁剤の例としては、メチルセルロース、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴム、トラガント末、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート等を挙げることができる。

20 溶液補助剤としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート80、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、マグロゴール、ヒマシ油脂肪酸エチルエステル等を挙げることができる。

安定化剤としては、デキストラン40、メチルセルロース、ゼラチン、亜硫酸ナトリウム、メタ亜硫酸ナトリウム等を挙げることができる。

25 等張化剤としては例えば、D-マンニトール、ソルビット等を挙げることができる。

保存剤としては例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロロクレゾール等を挙げることができる。



吸着防止剤としては例えば、ヒト血清アルブミン、レシチン、デキストラン、エチレンオキサイド・プロピレンオキサイド共重合体、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。

5 含硫還元剤としては例えば、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、炭素原子数1～7のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等が挙げられる。

10 酸化防止剤としては例えば、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 $\alpha$ -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤が挙げられる。

15 さらに、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩などの通常添加される成分を含んでいてもよい。

20 本発明の線維芽細胞動員剤等は、注射剤（皮下、皮内、筋肉内、静脈内、腹腔内、など）として、または経皮、経粘膜、経鼻などの投与に適した剤形、又は経口投与に適した剤形（錠剤、カプセル剤、顆粒剤、液剤、懸濁剤など）として投与することが可能である。本発明は投与経路や剤形などによって限定されるものではない。

25 本発明のG-CSFを有効成分とする線維芽細胞動員剤等の投与量、投与回数は対象の疾患患者の病状を配慮して当業者が適宜決定することができるが、通常、成人一人あたり0.1～500  $\mu\text{g/kg/day}$ 、好ましくは1～50  $\mu\text{g/kg/day}$ の用量でG-CSFを投与することができる。投与回数は一週間に1～7日間投与することができる。しかし、本発明はヒトG-CSFの用量によって限定されるものではない。

又、本発明の線維芽細胞動員剤等は、他の薬剤と併用してもよい。

## 実施例

### 実施例 1

#### 5 全骨髄移植

##### (1) 骨髄移植モデルマウスの作製

8～10週齢のC57BL/6マウス（CLEA、東京、日本）に、 $4 \times 10^6$  V linear accelerator を用いて致死量の放射線（850 cGy）を全身に単回照射し、レシピエントマウスとして用いた。GFPトランスジェニックマウス（C  
10 57BL/6、10～12週齢）（Okabe et al., (1997) FEBS. Lett. 407, 313-319）の大腿骨及び頸骨より骨髄粗分画を採取し、 $5 \times 10^6$ 個の骨髄細胞をレシピエントマウスの尾静脈より移植した。

レシピエントの骨髄中にドナー由来のGFP陽性骨髄細胞がどの程度生着しているか（これを「キメラ率」という）を確認するため、骨髄移植後60日の末梢  
15 血有核細胞について、FACS Calibur（Becton Dickinson, San Jose, CA, USA）を用いて解析を行った。結果を図1に示す。対照マウスでは骨髄有核細胞中にGFPの発現は認められないが、骨髄移植マウスの細胞は97.8%がGFP陽性であった。キメラ率の多寡はドナー由来のGFP陽性細胞を定量化する上で重要な指標となる。本実験では、骨髄移植モデルマウスとして、末梢血細胞の  
20 キメラ率が平均95%以上のマウスを使用した。これは、骨髄由来細胞の創傷治癒への貢献を定量評価するに足る条件を満たしているものと考えられる。

図2に骨髄のサイトスピン標本を示す。DAPI染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、ほとんどの有核細胞（青色）が緑色に発色しており、骨髄細胞がGFP陽性であることが示された。

#### 25 (2) 心筋梗塞マウスに対するG-CSF投与の効果

骨髄移植の60日後、マウスに0.5%イソフルランガスを吸入麻酔し、開胸して左心室を露出させ、左冠動脈を結紮して心筋梗塞を作製した。心筋梗塞作製後24時間に、生理食塩水に溶解した組換えヒトG-CSF（中外製薬（株）製）（100又は300  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）を1日1回、10日間連続してマウス

に皮下投与した（G-C S F 投与群）。対照群のマウスには生理食塩水のみを投与した。

### 生存率

G-C S F 投与群（300  $\mu$ g / kg）及び対照群について生存率（n = 68）を調べた（図3）。対照群の生存率は、心筋梗塞作製後60日で約60%であったが、G-C S F 投与群の生存率は約90%であった。

### 形態観察

心筋梗塞作製後60日に、正常マウス並びに対照群及びG-C S F 投与群のマウスについて、15MHz 整相列トランスデューサーを備えたイメージポイント1500超音波診断装置（Philips Co., USA）を用いて、経胸壁心エコー（Mモード心エコー）を行い、心筋梗塞巣の形態観察を行った。マウスは、ケタミン（30mg / kg）及びキシラジン（6mg / kg）で麻酔し、自発呼吸を維持させた。図4から明らかなように、対照群では、正常な左室と比較して、前壁部分の心筋が薄化し、無収縮であり、左室内径が拡大していた。これに対し、G-C S F 投与群（100  $\mu$ g / kg）では、左室拡張末期経の拡大の程度が対照群に比して抑制されていた。また、左室前壁は低収縮であるものの、対照群と比較すると有意に改善していた。

### 心機能

心筋梗塞作製後60日に、対照群及びG-C S F 投与群（100又は300  $\mu$ g / kg）のMモード画像より左室収縮末期内径（L V E S D）及び拡張末期内径（L V E D D）を測定した（n = 68）。また、拡張末期容量（E D V）及び収縮末期容量（E S V）を Teichholz 法により計算した。左室駆出率（E F）は下式により計算した。

$$E F (\%) = [(E D V - E S V) / E D V] \times 100$$

結果を、図5及び図6に示す。いずれもG-C S F 投与群で心機能の著しい改善が観察された。

### 組織学的観察

#### (i) 切片の作製

マウスをケタミン（30mg / kg）及びキシラジン（6mg / kg）で麻酔

し、心臓をPBSで灌流し、PBSに溶解した4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。心臓を取り出し、これをOCT化合物(Miles Scientific, Naperville, IL, USA)中に包埋し、液体窒素で急速凍結した。包埋した心臓をスライスして切片を作製した。

5 (ii) アザン染色

心筋梗塞作製後60日に、対照群及びG-CSF投与群(300  $\mu$ g/kg)の心臓左心室短軸断面の凍結切片についてアザン染色を行った。結果を図7(a)に示す。対照群では左心室の径の拡大、梗塞巣の「ひ薄化」・伸展化が観察され、  
10 いわゆる心筋梗塞後のリモデリングが観察された。これに対し、G-CSF投与群では梗塞後のリモデリングは軽度であり、梗塞巣の「ひ薄化」・伸展化は軽減していた。すなわち、G-CSF投与により、心筋梗塞巣の組織が再生され、リモデリングが防止されたことが明らかとなった。

また、G-CSF投与群の切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、心筋梗塞巣にGFP陽性骨髄細胞が多数浸潤していることが示された(図7(b)、  
15 右図)。

(iii) 免疫染色

凍結切片(6  $\mu$ m)をPBSで洗浄し、抗体を用いて4℃で一晩染色した。その後、PBSで3回洗浄し、TRITC(DAKO, Japan)結合2次抗体とともに4℃で4時間インキュベートした(赤色)。核はDAPI(Sigma Aldrich)で染色した(青色)。  
20

共焦点レーザー顕微鏡(LSM410; Carl Zeiss, Jena, Germany)で心筋梗塞巣の観察を行った(図8)。非梗塞巣の切片は、抗 $\alpha$ -アクチニン抗体(clone EA-53; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)を用いて染色した。心筋細胞が赤く染色され、血管内にはGFP陽性細胞がわずかに残存していた(a)。対照群の梗塞巣では、わずかにGFP陽性細胞が観察されるのみであった(b)。これに対し、  
25 G-CSF投与群(300  $\mu$ g/kg)では梗塞巣に多数のGFP陽性細胞が観察された(c)。ドナーマウスとしてLac-Zトランスジェニックマウス(10~12週齢: Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA)を用いて(c)と同様の実験を行うことにより、(c)の梗塞巣における緑色の蛍光が非特異的な蛍



光でないことを確認した (d)。また、共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像をコンピュータに取り込み、NIHイメージで解析した。梗塞巣に存在する単位面積あたりの細胞数に対するGFP陽性細胞数を計算した。結果を図9に示す。G-CSF投与により、骨髓由来の細胞が心筋梗塞巣に遊走したことが明らかとなった。

次に、このGFP陽性細胞が如何なる細胞であるかを確認した。

図10に抗 $\alpha$ -平滑筋アクチン抗体 (clone 1A4; Sigma Aldrich) を用いて免疫染色を行った結果を示す。骨髓由来のGFP陽性細胞が赤く染色されており、平滑筋細胞に分化していることが明らかとなった。

次に、内皮細胞マーカーであるフォンビルブランド因子 (vWF) について、抗vWF抗体 (clone F8/86; DAKO) を用いて免疫染色を行った (図11)。GFPシグナルがvWFのシグナルに囲まれている領域が認められ、GFP陽性細胞は内皮細胞にも分化していることが明らかとなった。

さらに、抗 $\alpha$ -アクチニン抗体を用いて、心筋細胞を免疫染色した (図12～図14)。図12及び図13から明らかなように、GFP陽性細胞にアクチニン陽性シグナルが認められた。また、そのうちのいくつかには横紋が見られ、心筋細胞であることが示唆された。GFP陽性細胞により、完全な横紋をもつ心筋が再生された。図14は1 $\mu$ mごとにスライスした切片の写真である。骨髓由来のGFP陽性細胞が完全な心筋細胞を再生していることが示された。

心筋梗塞作製後60日に心筋梗塞巣に観察されたGFP陽性細胞中に占める、心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞及び線維芽細胞の比率を図15にまとめる。細胞数は以下のようにして求めた。心臓を心尖部、中部、基部に3分割し、各々のGFP陽性細胞の面積と組織の厚みより梗塞部組織の体積を算出した。単位面積当たりのGFP陽性細胞数を計測し、GFP陽性細胞密度を求めた。GFP陽性細胞密度と梗塞部体積より、梗塞部組織中のGFP陽性細胞の細胞数を算出した。80%以上の細胞は紡錘形をしており、造血細胞とは異なる形態をしていた。また、これらの細胞はCD45陰性、Mac-1陰性であった。すなわち、心筋梗塞巣に最も多く存在するのは線維芽細胞であることが示された。

## 実施例 2

## 骨髓由来単一造血幹細胞の移植

GFPトランスジェニックマウスより骨髓を採取し、セルソーターでGFP陽性画分を分離後、c-kit陽性、Sca-1陽性、lineage抗原陰性、CD34陰性の造血幹細胞を回収した。このうちの細胞1個と、別の正常ドナーマウスから採取した骨髓粗分画の $5 \times 10^6$ 個の細胞とを、致死量放射線を照射したレシピエントマウスに骨髓移植した。3ヶ月後、骨髓におけるGFP陽性細胞の生着率を確認した。麻酔開胸後、左冠動脈を結紮して心筋梗塞を作製した。その後、G-CSF ( $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) を10日間皮下投与した。G-CSF投与後10日における末梢血有核細胞数は、全骨髓移植群と単一造血幹細胞移植群で共に約30,000ぐらいであり、差は見られなかった(図16)。

単一造血幹細胞移植群(直線)と全骨髓移植群(点線)について、G-CSF投与(四角)及び非投与(丸)の場合における生存率を調べた(図17)。全骨髓移植群のみならず、単一造血幹細胞移植群においても、G-CSF投与により、有意に生存率が改善された。

次に、実施例1と同様の方法により単一造血幹細胞移植群の心筋梗塞巣の切片を作製し、抗ビメンチン抗体(PROGEN BIOTECHNIK GMBH 社製、Cat. No. GP53)を用いて免疫染色を行った。図18から明らかなように、心筋梗塞巣においてGFP陽性細胞の存在が認められた。1個のGFP陽性造血幹細胞が心筋梗塞巣において生着していることが明らかとなった。また、抗ビメンチン抗体で染色されていることから、線維芽細胞への分化が認められた。

さらに、単一造血幹細胞移植群と全骨髓移植群について、G-CSF投与及び非投与の場合におけるGFP陽性細胞数を実施例1と同様にして測定した(図19)。全骨髓移植群のみならず、単一造血幹細胞移植群においても、G-CSF投与により有意にGFP陽性細胞数が増加していた。

単一造血幹細胞移植群にG-CSF投与した場合の左心室切片について抗心筋アクチニン抗体を用いて免疫染色を行った(図20)。GFP陽性細胞がアクチニン陽性となっており、心筋細胞に分化していることが示された。

上記実施例1及び2において、数値は平均 $\pm$ SEMで示した。平均値間の有意

差はANOVAにより算出した。対照群とG-CSF投与群との比較は、log-rank検定又はノンパラメトリックなFisherの多重比較検定で行った。p<0.05を有意とした。

### 5 実施例 3

- 致死量の放射線照射を行った8～10週齢のC57BL/6マウスに、CAG-E GFPマウス (Okabe M. et al., FEBS Lett. 1997, 407: 313-319) の骨髓から採取した全骨髓細胞 (w-BM)、又はc-kit陽性、Sca-1陽性、lineage抗原陰性の単一集団細胞 (KSL-SP) を尾静脈より移植した。
- 10 8週間後、左冠動脈の結紮によりマウスに心筋梗塞 (MI) を作製した。MI作製後24時間に、生理食塩水 (G-CSF (-)) 又は300  $\mu$ g/kg/dayのG-CSF (G-CSF (+)) を1日1回、10日間連続してマウスに皮下投与した。MI作製後8週に、マウスを解剖し、心臓を免疫組織学的に解析した。
- 15 各マウス群 (n=10) あたり100サンプル標本について、梗塞巣のGFP陽性細胞、GFP陽性ビメンチン陽性細胞、及びGFP陽性アクチニン陽性細胞を計測した。GFP陽性細胞の平均値を表1に示す。

表1 梗塞巣におけるGFP陽性細胞の定量解析

マウス	GFP陽性細胞		
	計*	ビメンチン陽性	アクチニン陽性
w-BM G-CSF (-)	8841	1813	65
w-BM G-CSF (+)	119802	37457	5403
KSL-SP G-CSF (-)	1224	480	0
KSL-SP G-CSF (+)	41779	9322	3

20 \* : 梗塞巣の全GFP陽性細胞数

w-BM群ではビメンチン陽性細胞 (線維芽細胞) とアクチニン陽性細胞 (心筋細胞) が全骨髓から再生されたが、KSL-SP群では線維芽細胞のみが再生さ

れた。この結果は、造血幹細胞からは心筋細胞が再生されないことを示唆している。心筋細胞の再生は間葉系幹細胞からの分化によると考えられる。

次に G-CSF の効果をみると、w-BM 群では線維芽細胞及び心筋細胞を動員した。KSL-SP 群では線維芽細胞を動員させたが、心筋細胞はわずか 3 細胞のみが観察された。この心筋細胞はおそらく再生されたものではなく、細胞融合の結果であると思われる。

いずれの群でも、図 17 に示すように、G-CSF 投与によって生存率が改善している。これらの効果には、w-BM 群では線維芽細胞及び心筋細胞の動員が寄与しており、KSL-SP 群では線維芽細胞の動員が寄与している。特に、線維芽細胞の増加は心筋梗塞部位の創傷治癒に働き、死亡率との相関が知られているリモデリングの抑制を促進するものとして重要である。

#### 産業上の利用可能性

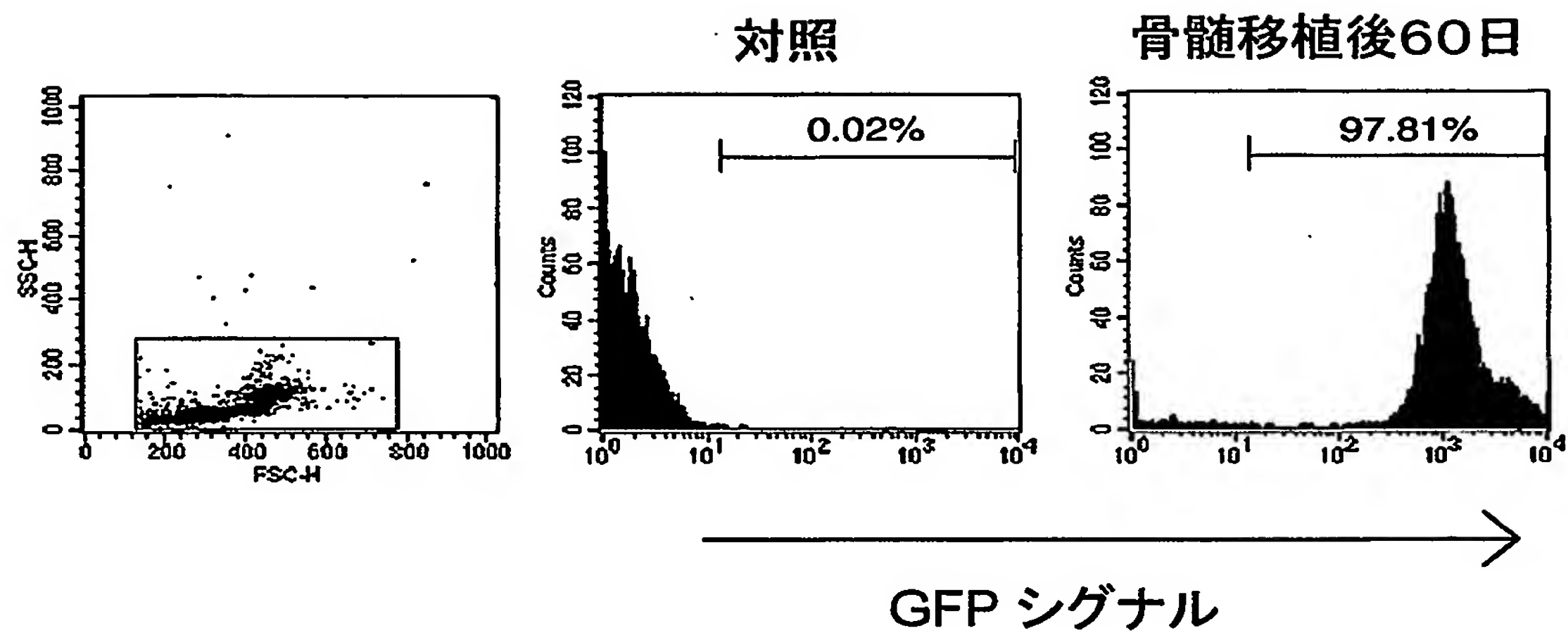
本発明の線維芽細胞動員剤を用いることにより、わずかな骨髓由来細胞を遊走させるだけで、線維芽細胞を移植することなく心筋梗塞巣などの組織を再生し、生存率を向上させることが可能である。また、本発明の創傷治療剤を用いることにより、創傷部位の強固な治癒が可能である。



## 請 求 の 範 囲

1. 顆粒球コロニー刺激因子（G－C S F）を有効成分として含む線維芽細胞動員剤。
- 5 2. 創傷した組織に線維芽細胞を動員することを特徴とする請求項 1 記載の動員剤。
3. 心臓へ線維芽細胞を動員することを特徴とする請求項 1 記載の動員剤。
4. 心臓が心疾患発症後の心臓であることを特徴とする請求項 3 記載の動員剤。
- 10 5. 心疾患が心筋梗塞である請求項 4 記載の動員剤。
6. G－C S F を有効成分として含む、心疾患発症後の心臓における線維芽細胞の生着剤。
7. 心疾患が心筋梗塞である請求項 6 記載の生着剤。
8. 心疾患発症後の心臓が、心筋梗塞後の心筋梗塞巣である請求項 6 記載の生
- 15 着剤。
9. G－C S F を有効成分として含む創傷治療剤。
10. 有効量の G－C S F を投与することを含む、線維芽細胞動員方法。
11. 有効量の G－C S F を投与することを含む、線維芽細胞を心疾患発症後の心臓に生着させるための方法。
- 20 12. 有効量の G－C S F を投与することを含む、創傷治療方法。

図 1



BEST AVAILABLE COPY

図 2



緑: GFP  
青: DAPI

図3

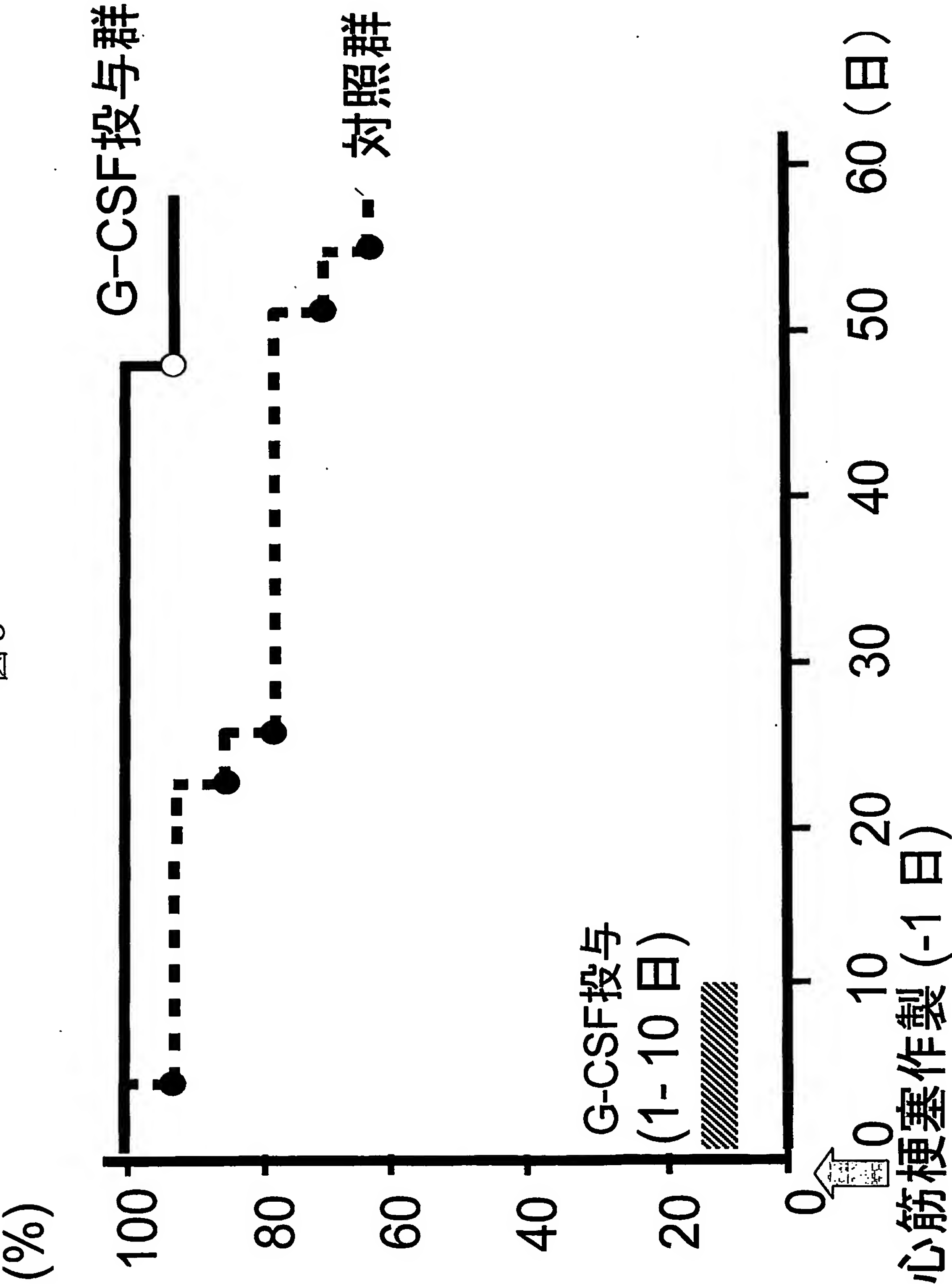
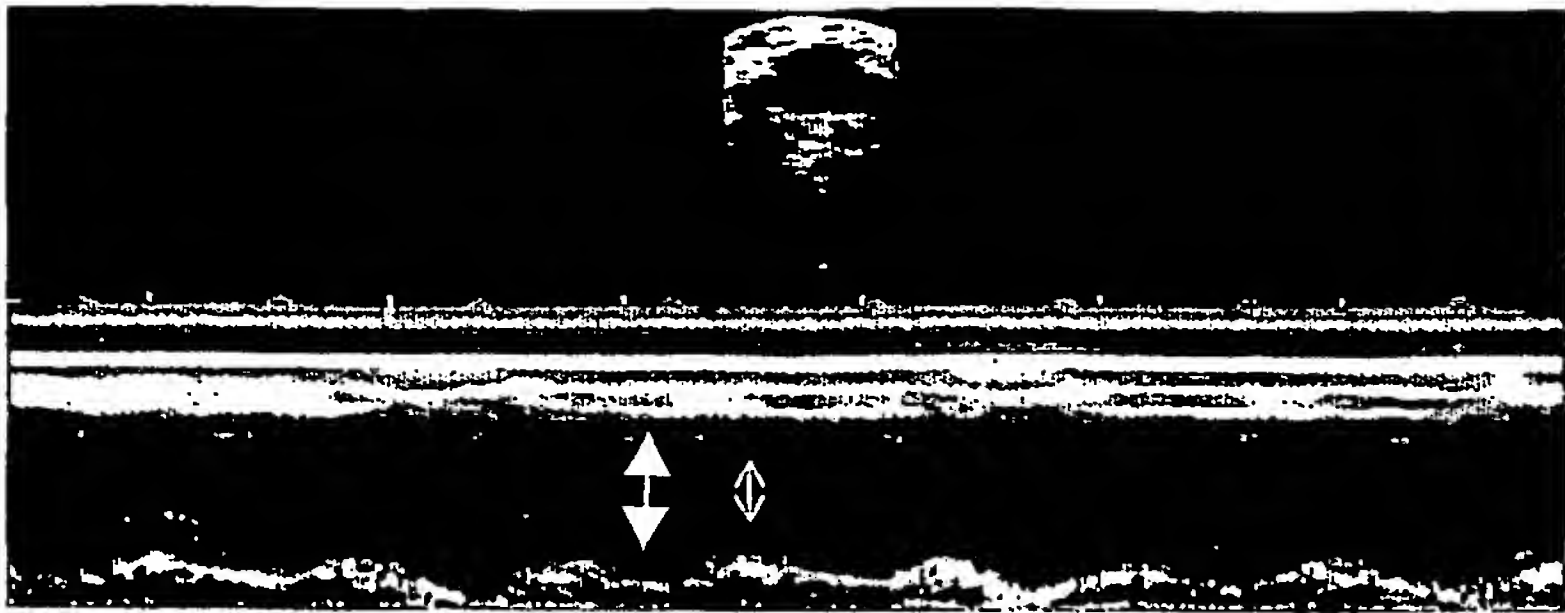




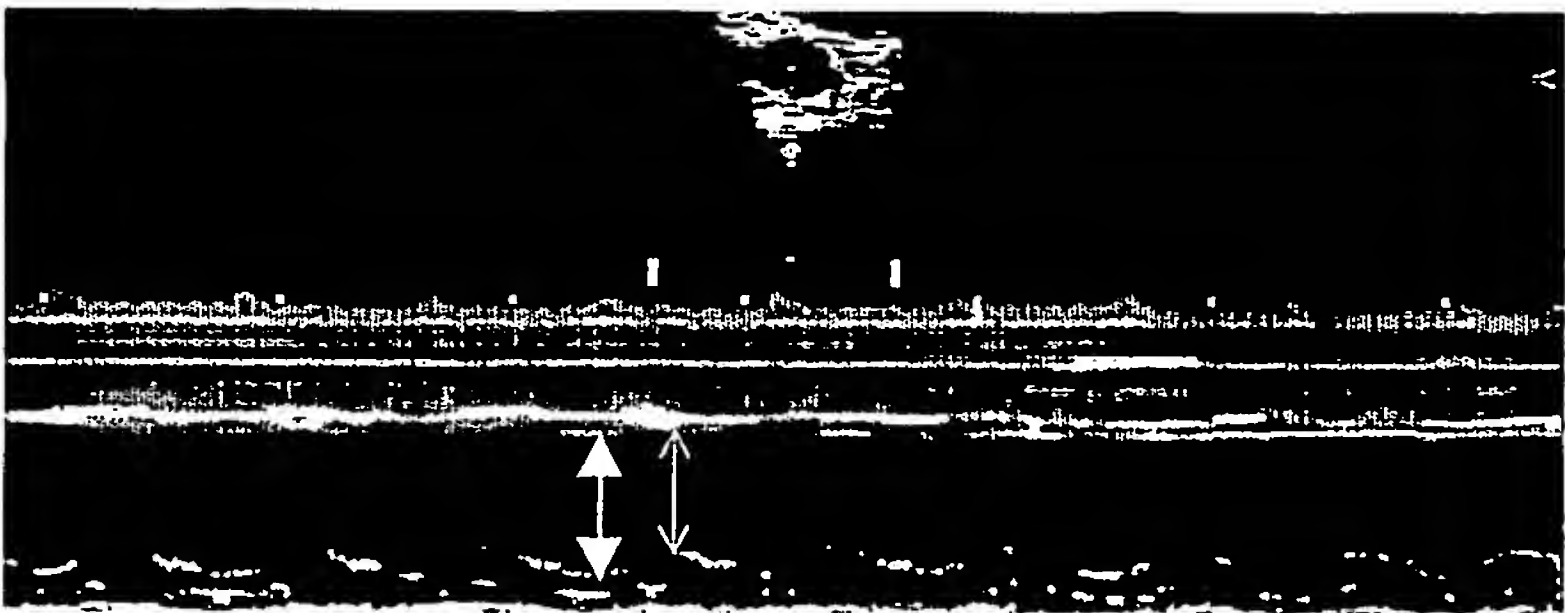
図 4

BEST AVAILABLE COPY

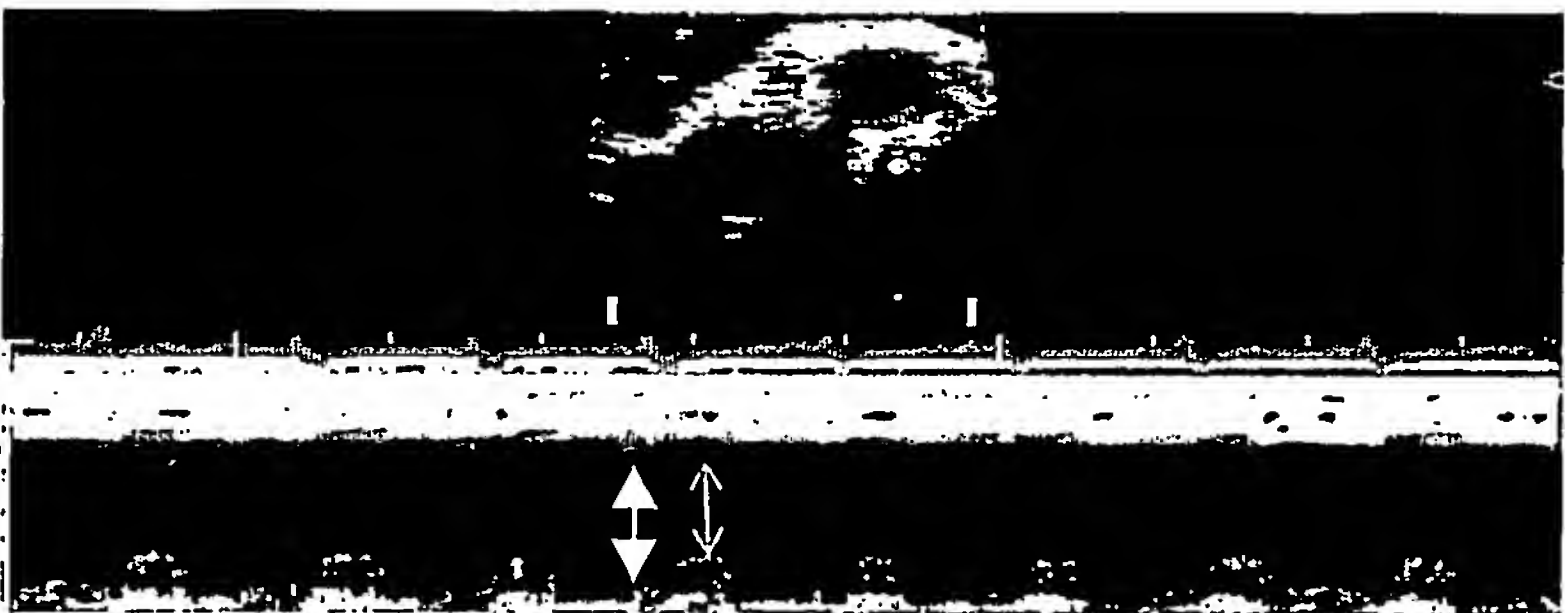
正常



対照



G-CSF投与  
(100  $\mu$ g/kg)



(骨髓移植後60日)

↑↓ 左室拡張末期径  
↑↓ 左室収縮末期径

図 5

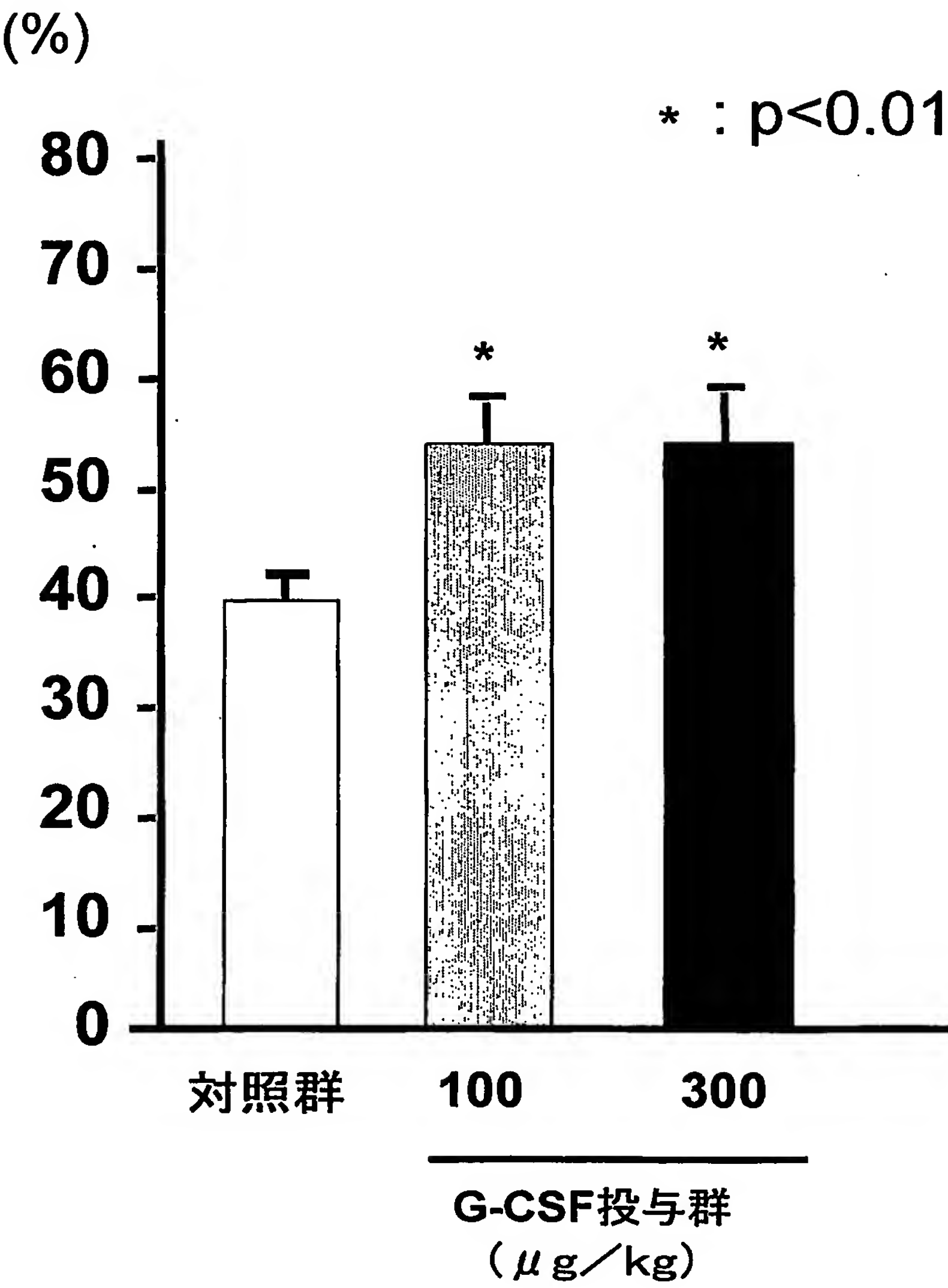


図 6

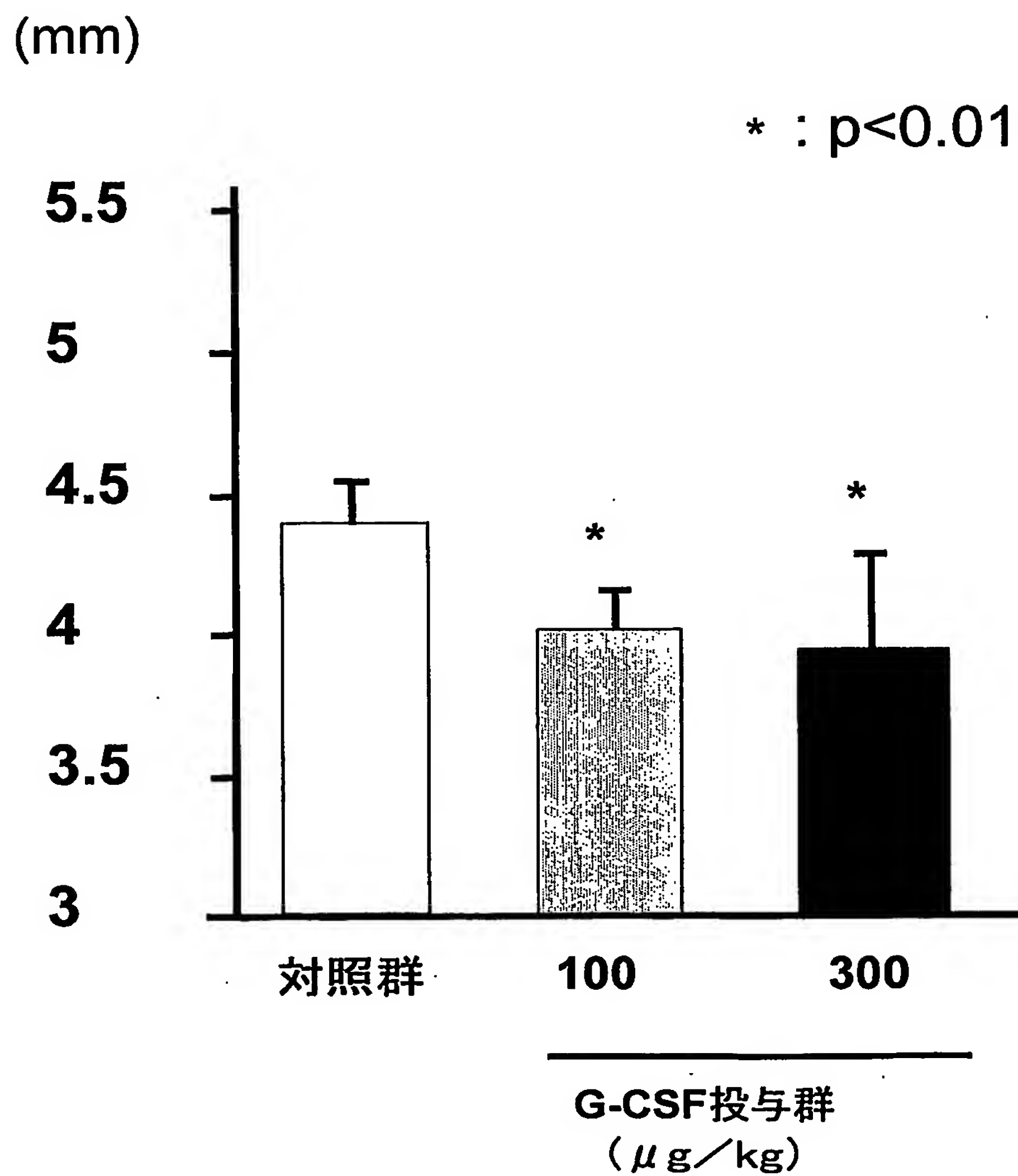
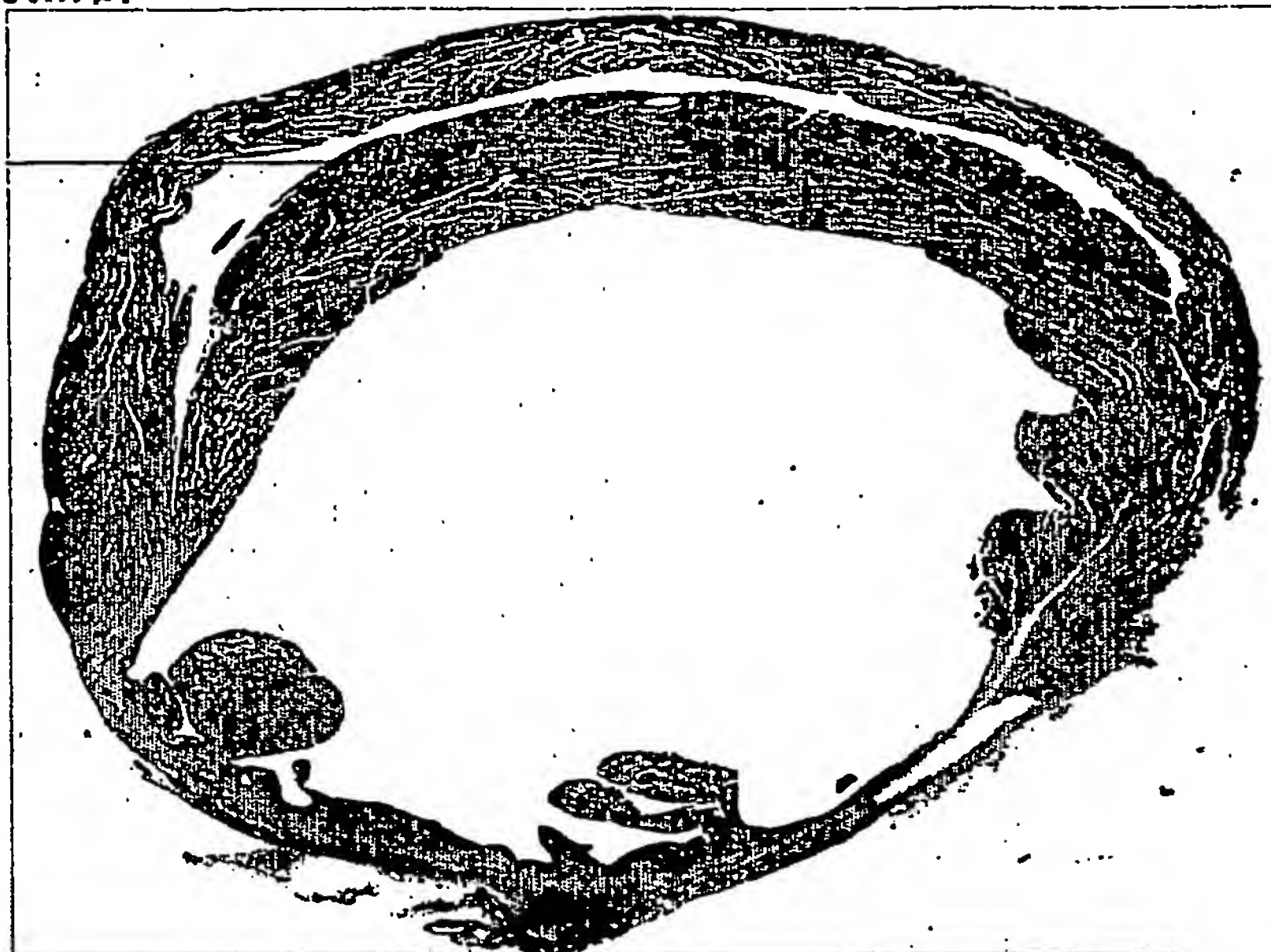


図 7 (a)

アザン染色

BEST AVAILABLE COPY

対照群



G-CSF投与群

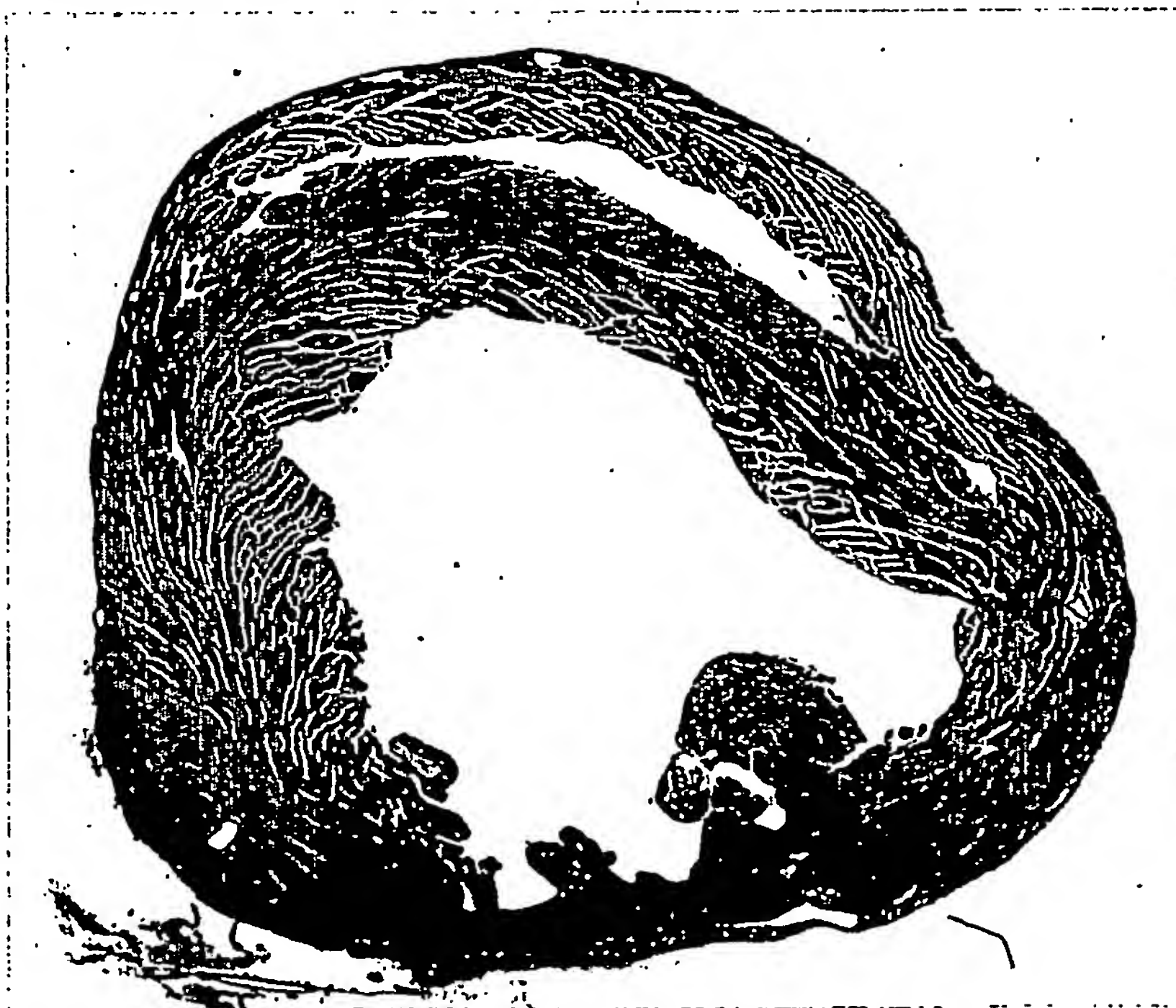
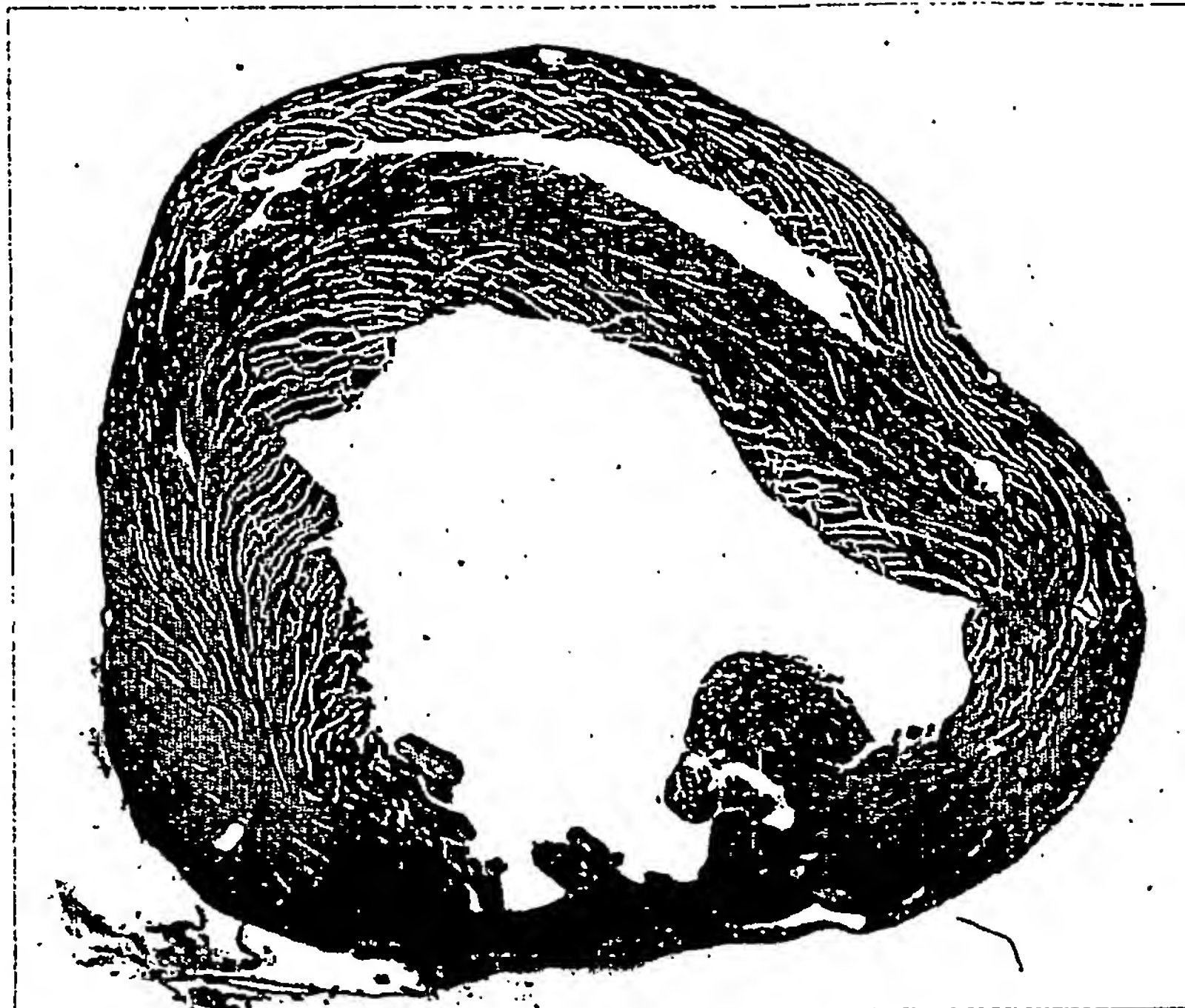




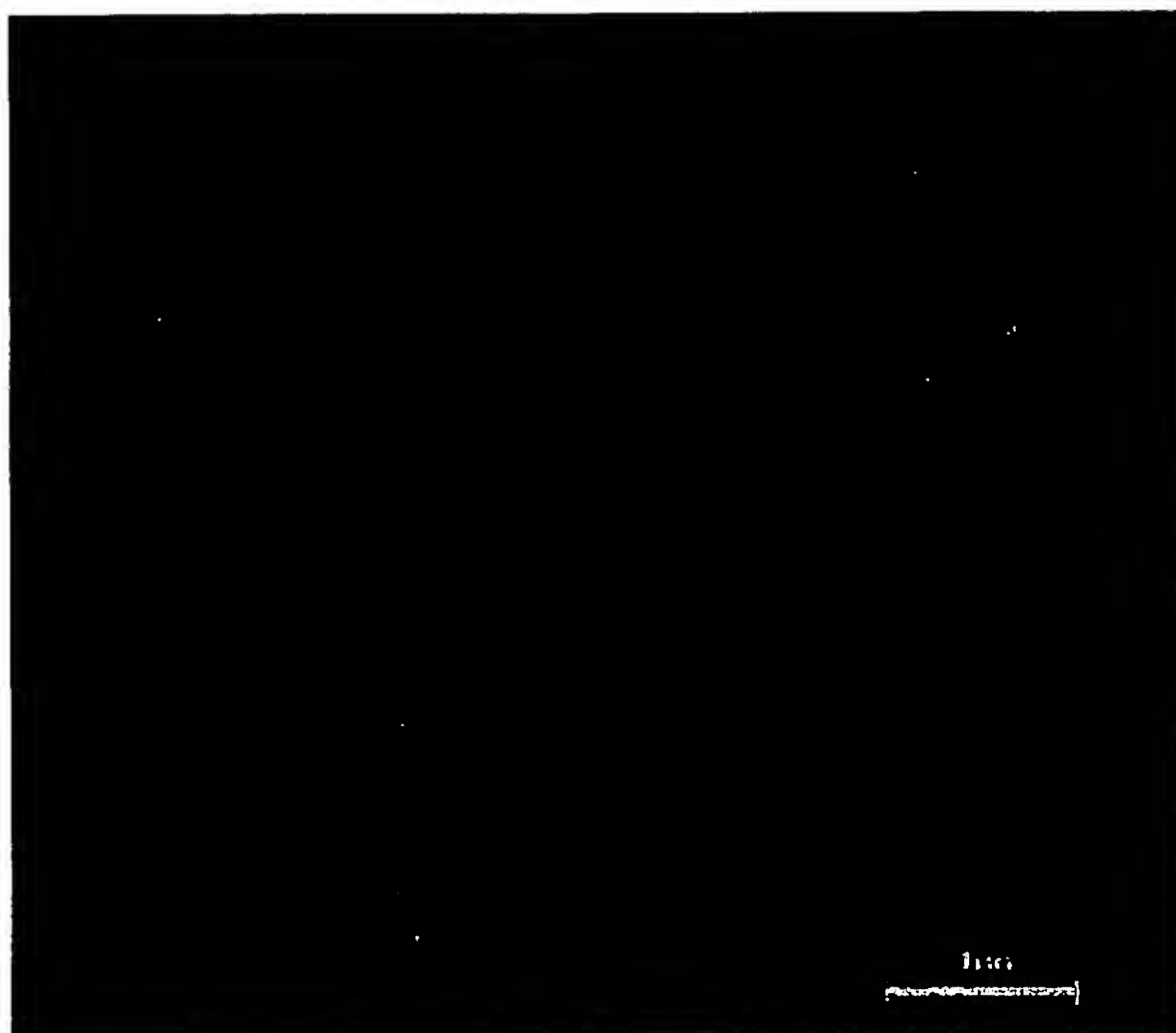
図 7 (b)

BEST AVAILABLE COPY

アザン染色



共焦点レーザー顕微鏡



心筋梗塞後60日

BEST AVAILABLE COPY

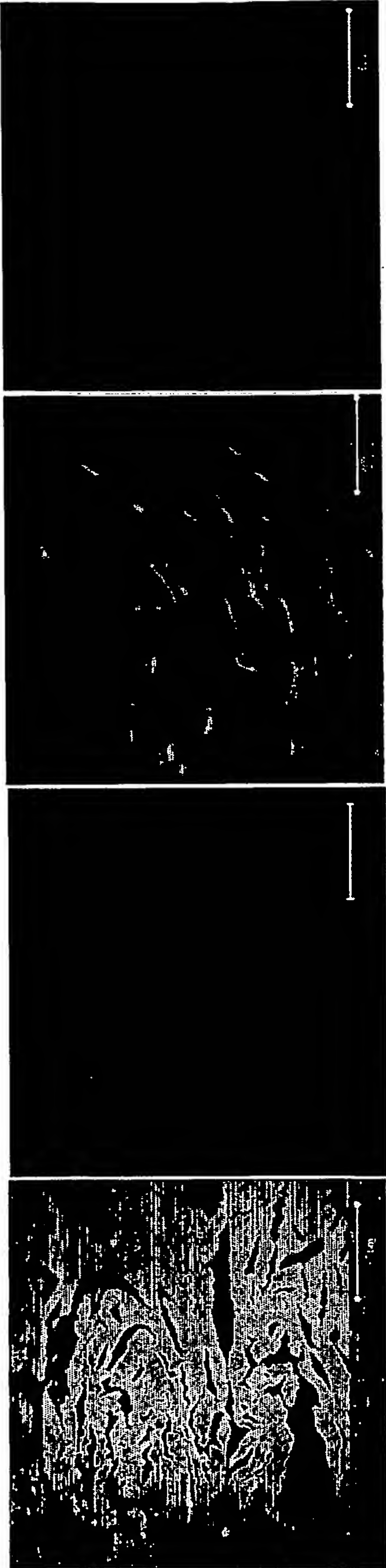
図8

(a) (b) (c) (d)

非梗塞部位 梗塞部位

対照群

G-CSF群



GFP-Tgマウス骨髄移植群

LacZ-Tg マウス  
骨髄移植群

緑: GFP

赤: 抗 $\alpha$ -アクトニン抗体

青: DAPI

心筋梗塞後60日目

図 9

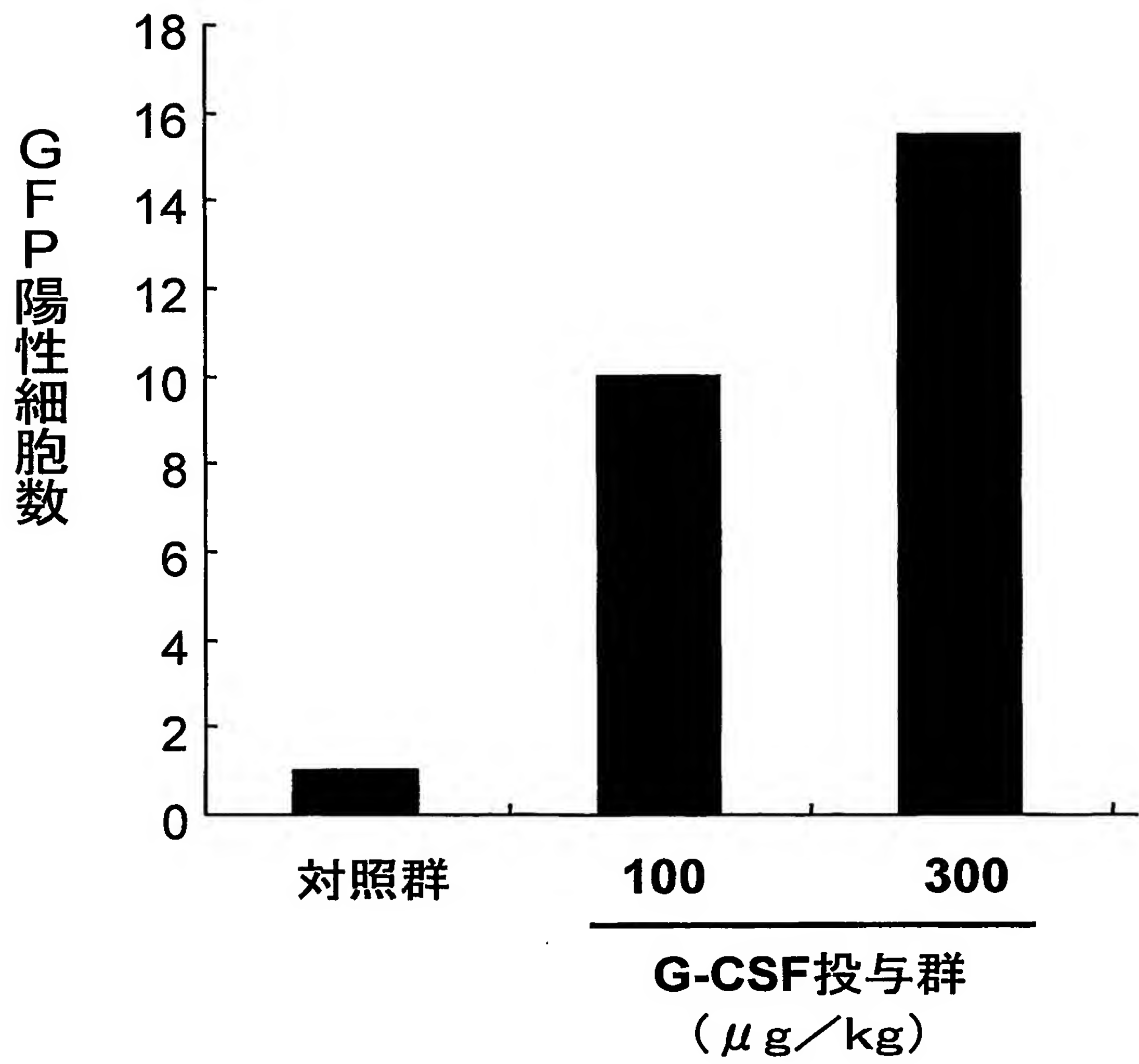
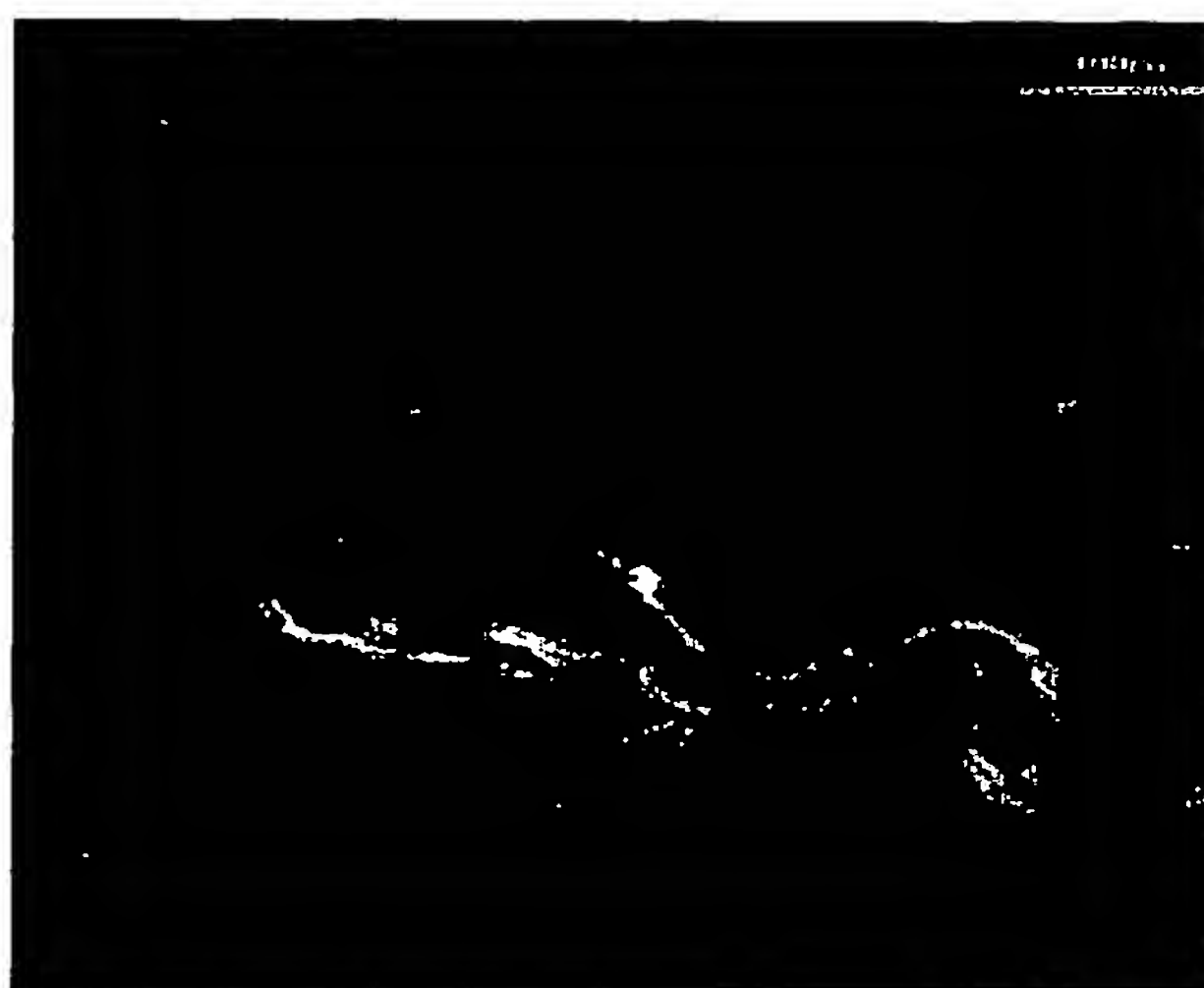
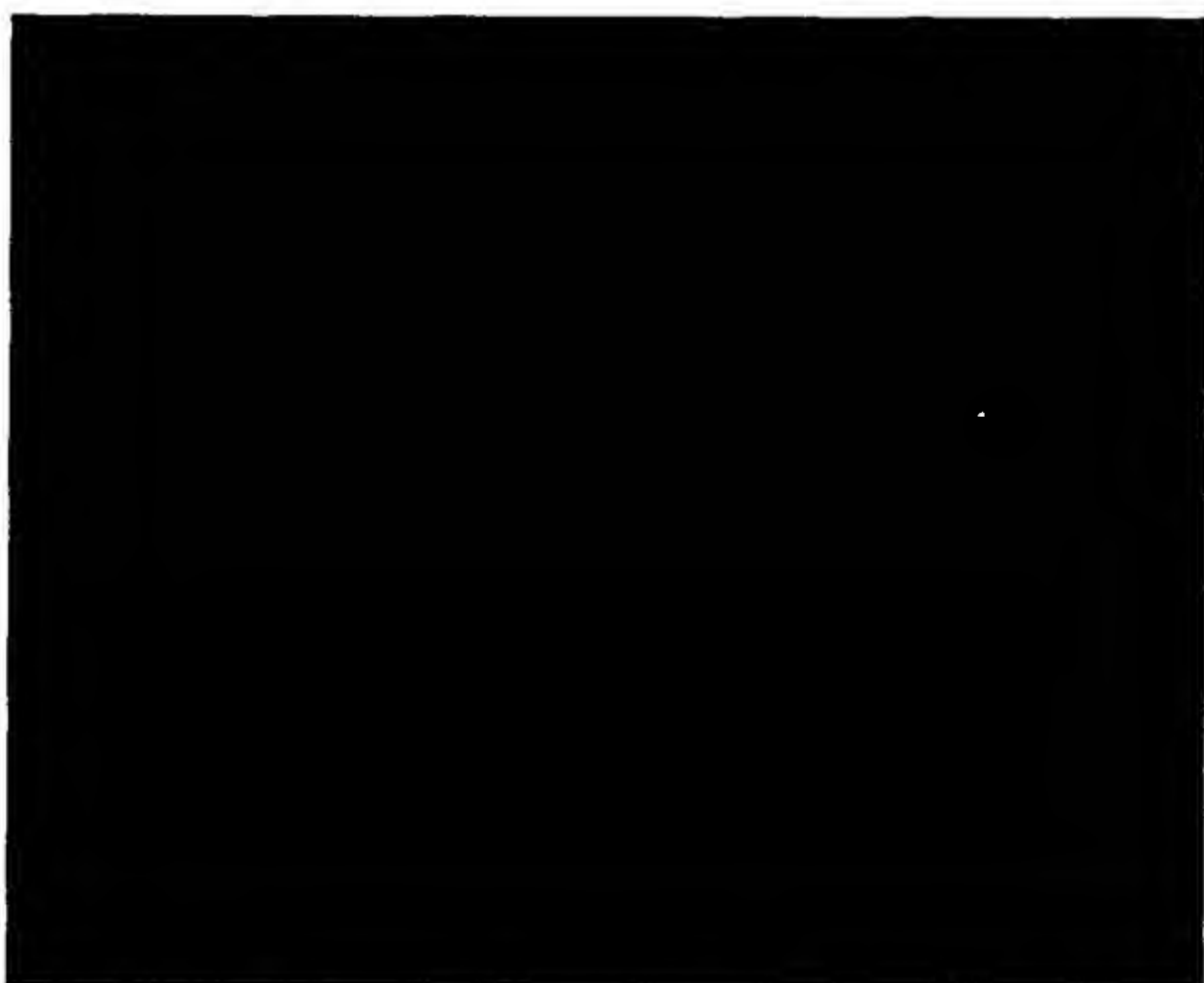


図 1 0

BEST AVAILABLE COPY

抗  $\alpha$  - 平滑筋アクチン抗体

GFP



DAPI

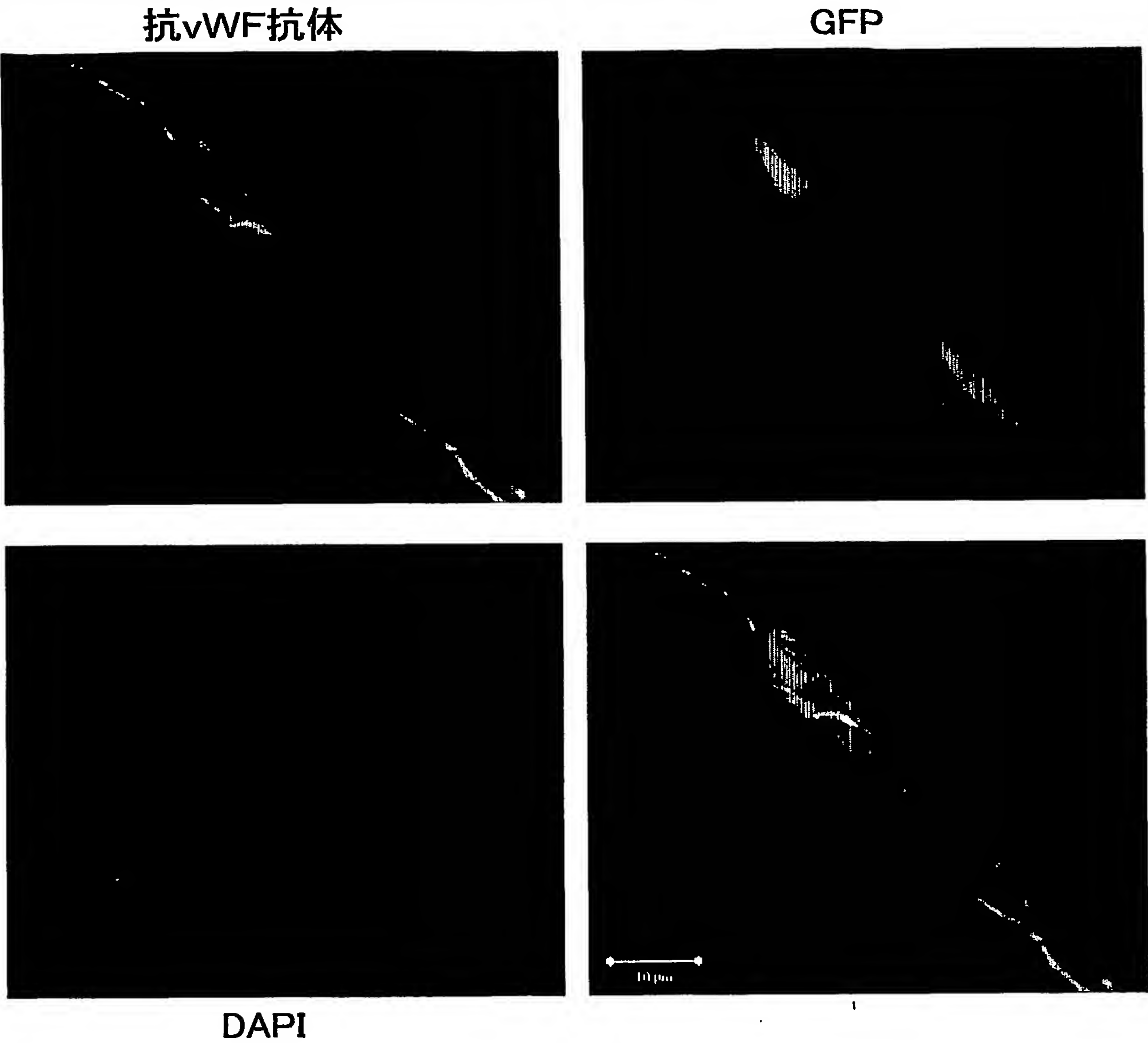
緑: GFP

赤: 抗  $\alpha$  - 平滑筋アクチン抗体

青: DAPI

BEST AVAILABLE COPY

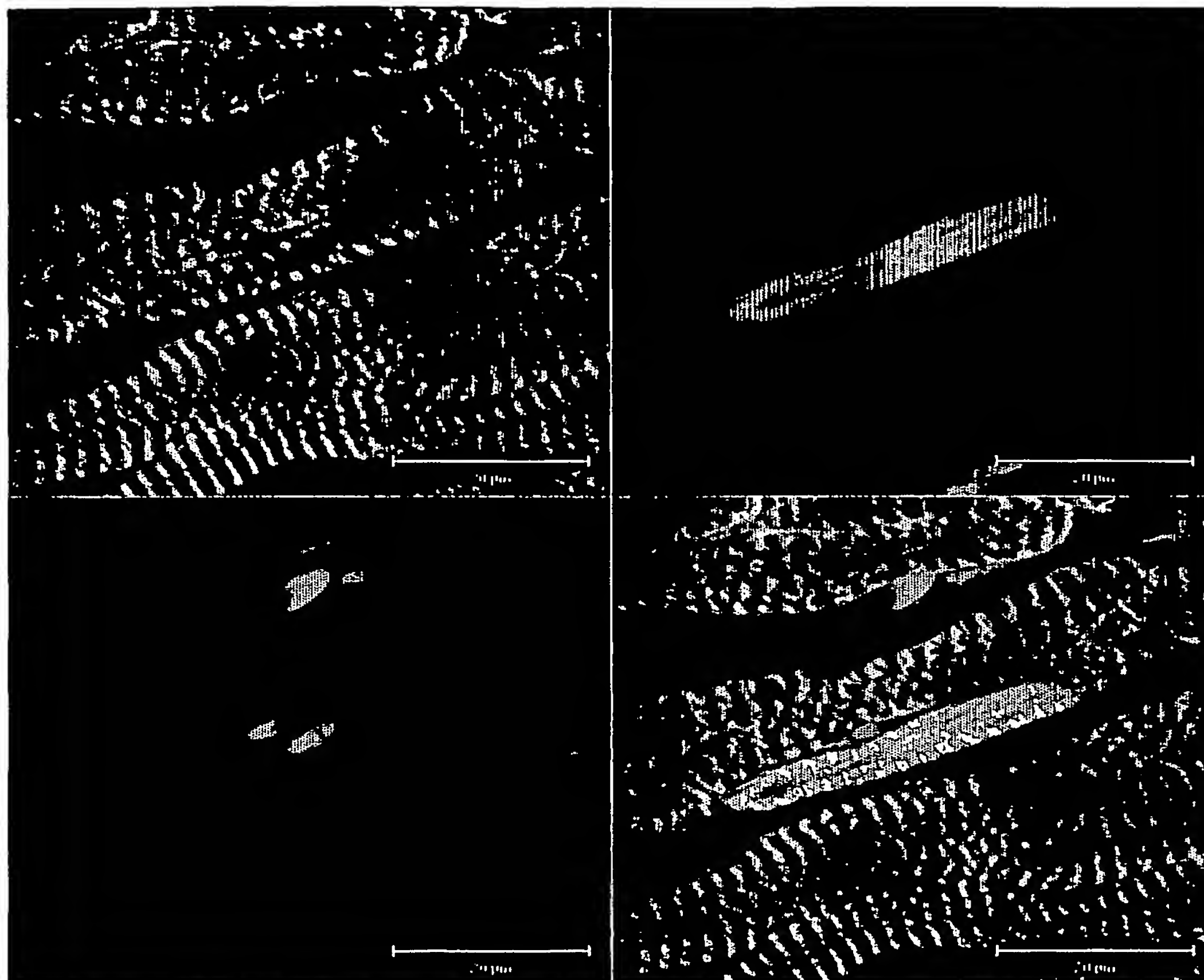
図 1 1



緑: GFP  
赤: 抗vWF抗体  
青: DAPI



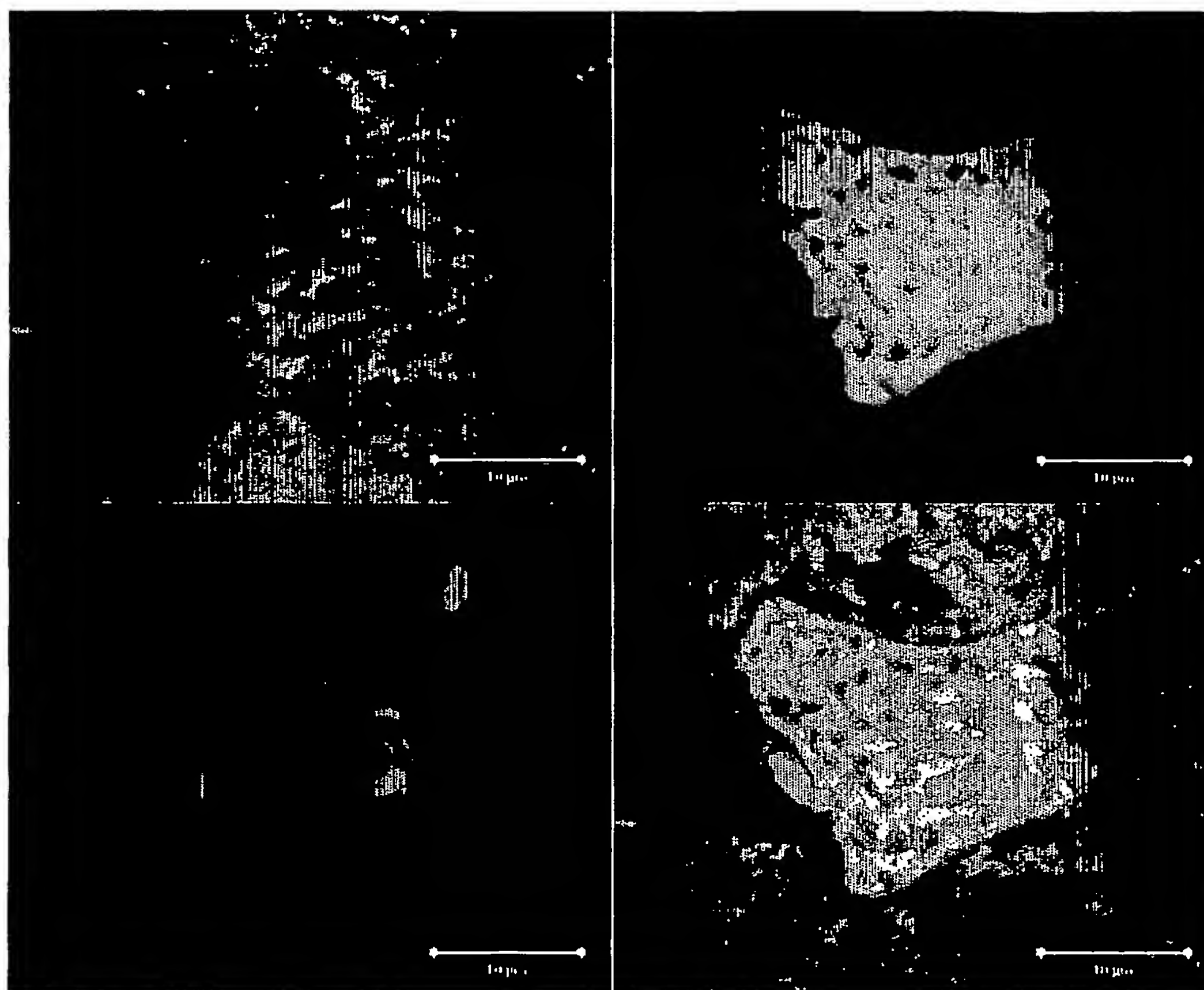
BEST AVAILABLE COPY  
図 1 2



緑: GFP  
赤: 抗心筋アクチニン抗体  
青: DAPI

BEST AVAILABLE COPY

図 1 3



緑: GFP  
赤: 抗心筋アクチニン抗体  
青: DAPI

BEST AVAILABLE COPY  
図 1 4

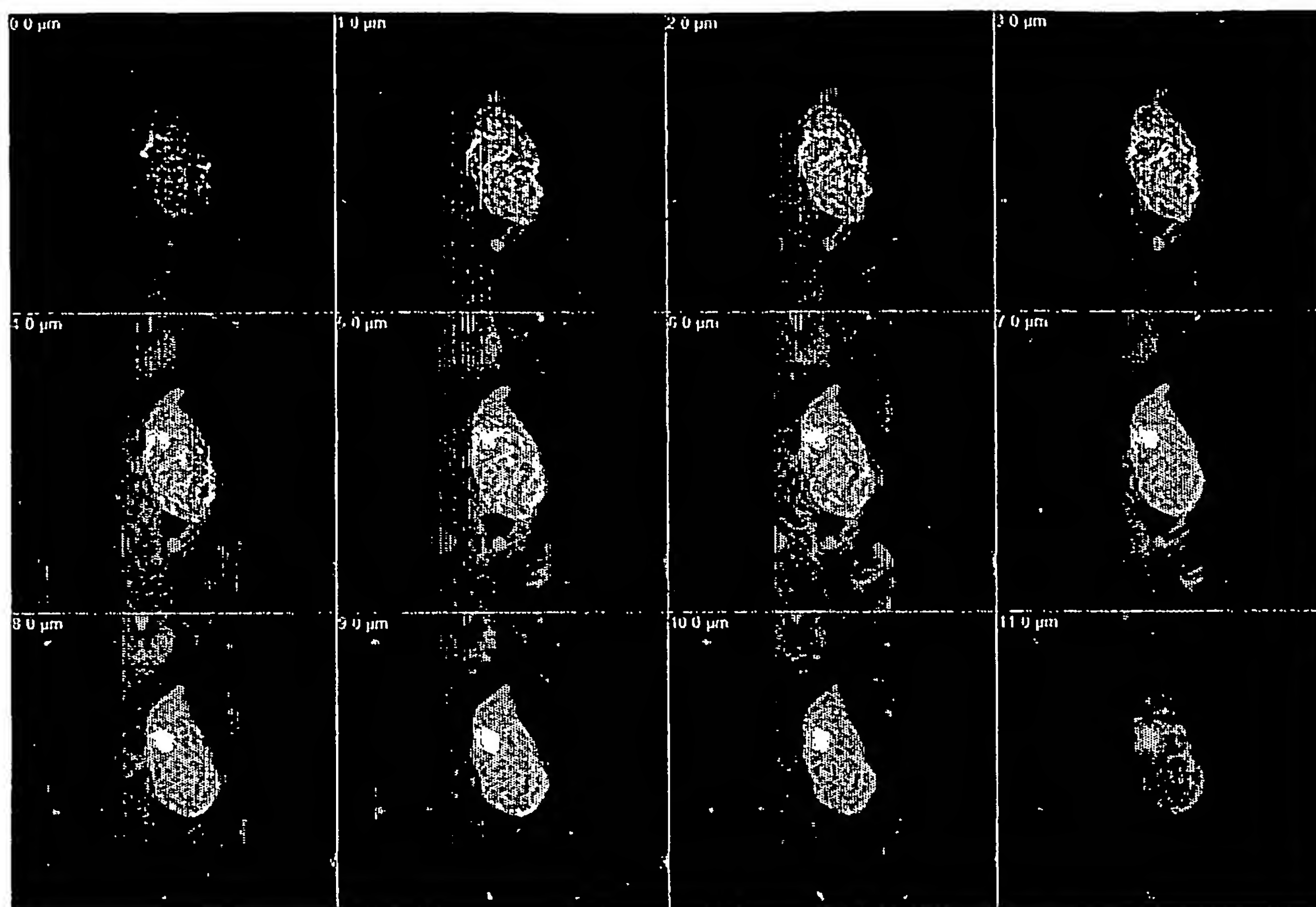
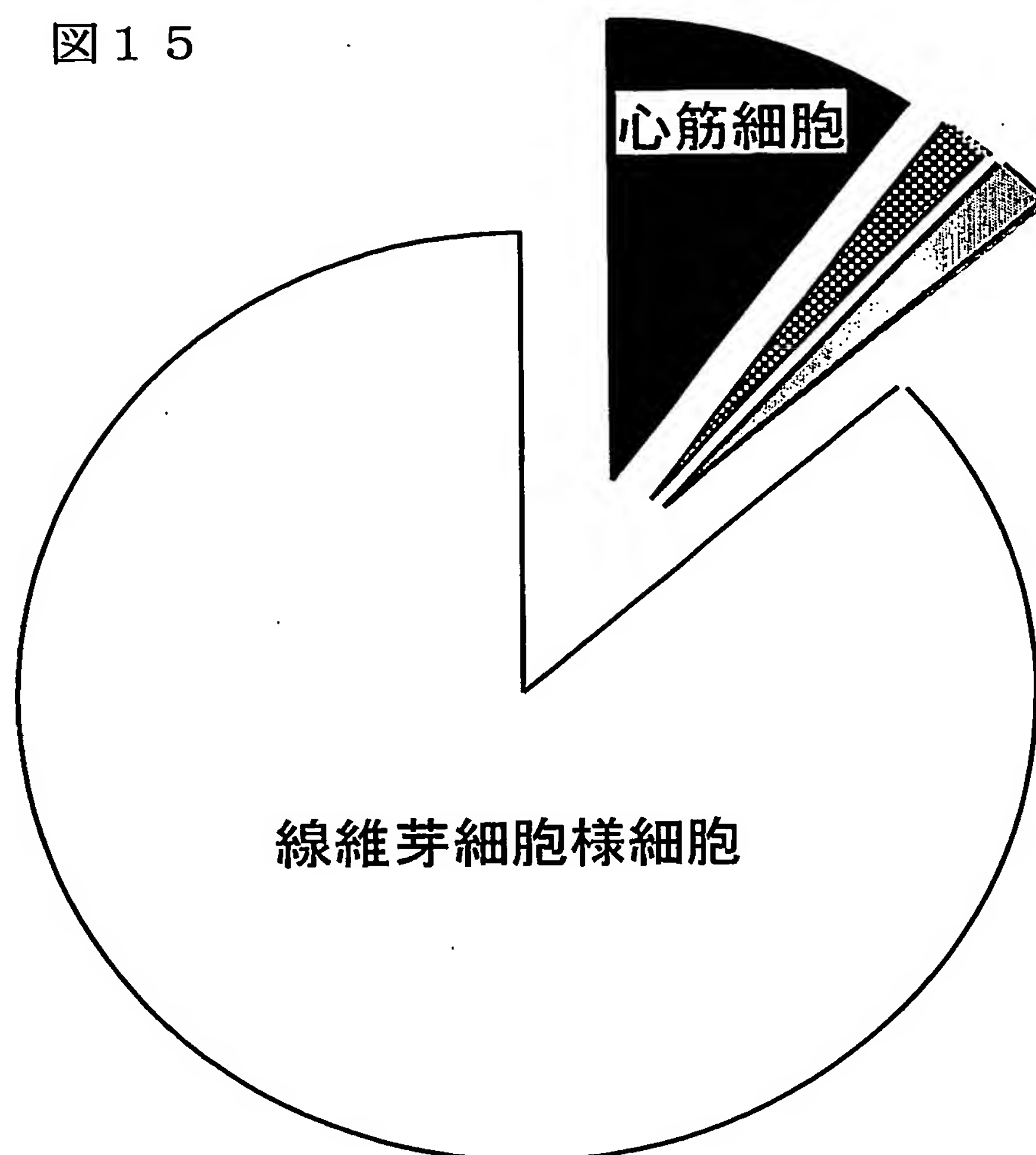


図 1 5



- 心筋細胞
- ▣ 平滑筋細胞
- ▤ 血管内皮細胞
- 線維芽細胞様細胞

図 16

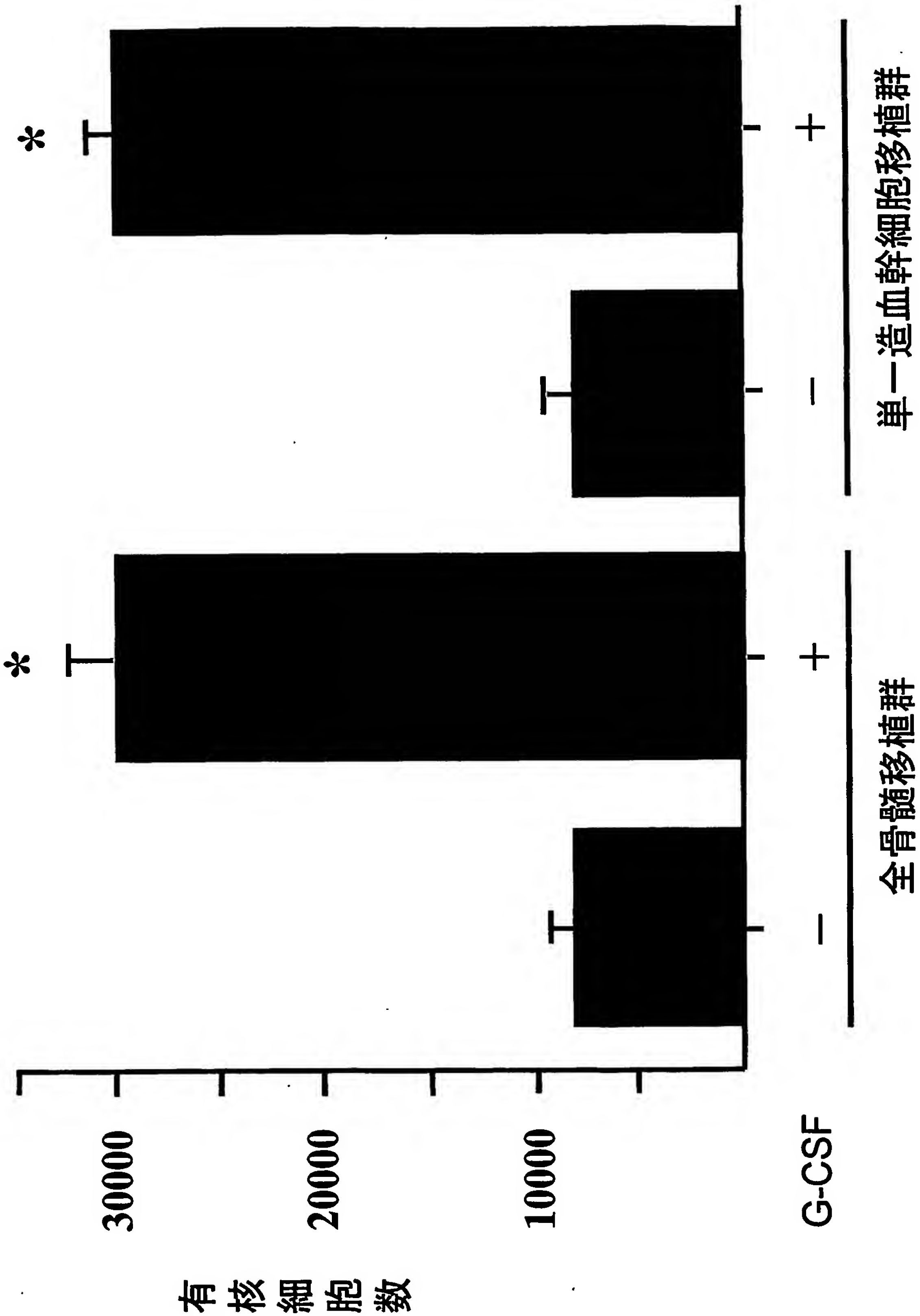




図17

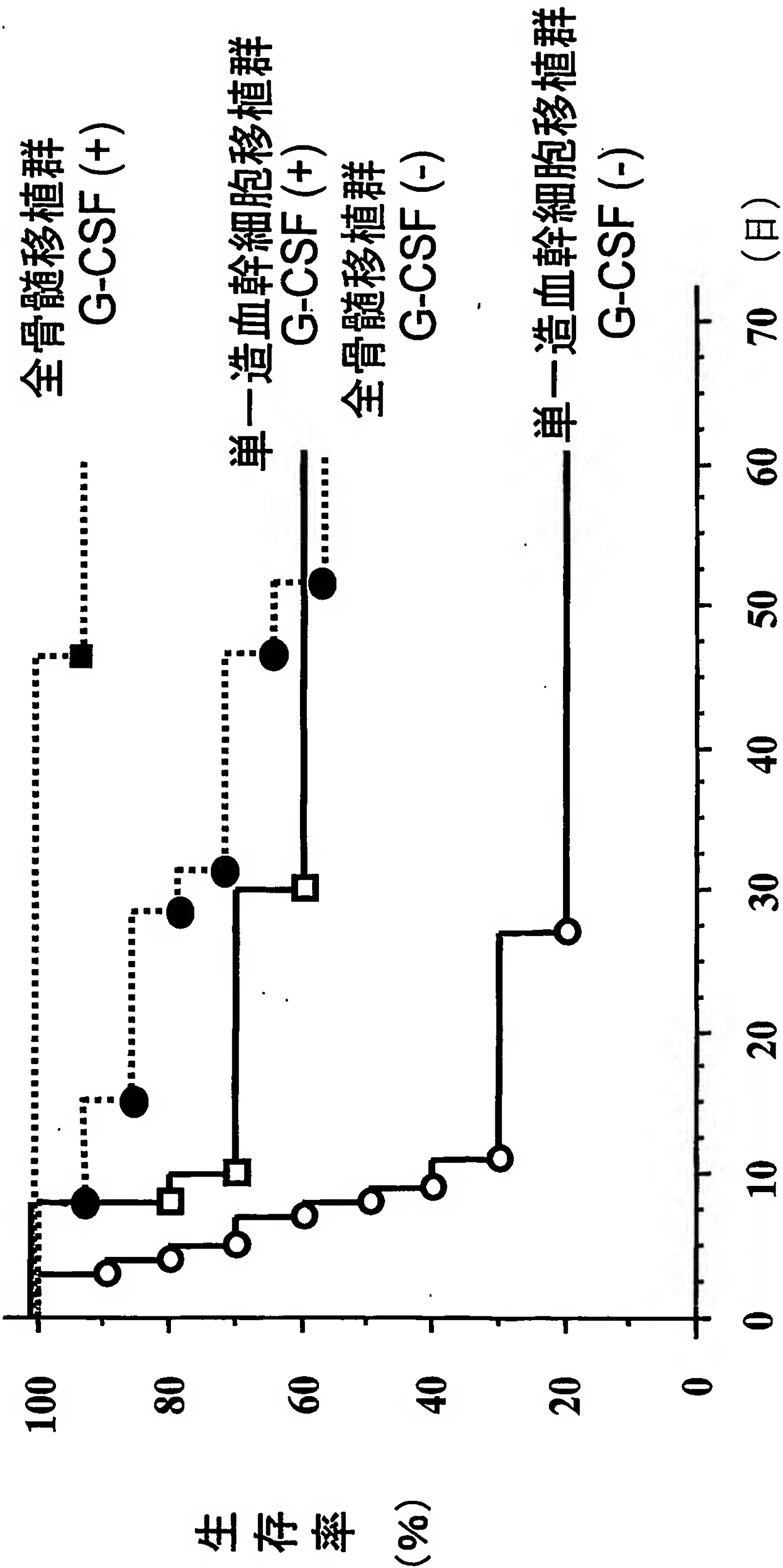
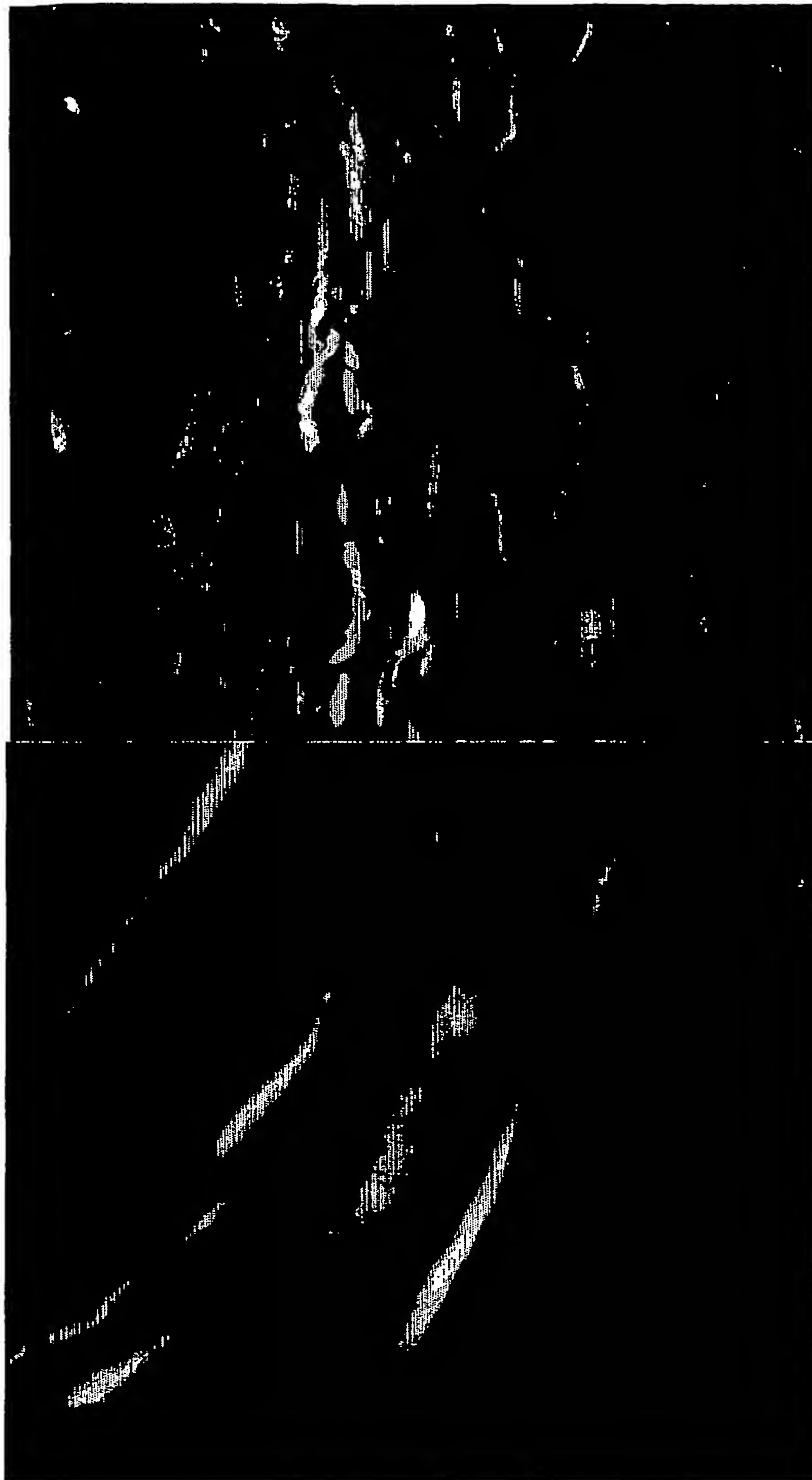


図 18



緑: GFP  
赤: 抗ビメンチン抗体  
青: DAPI

図 1 9

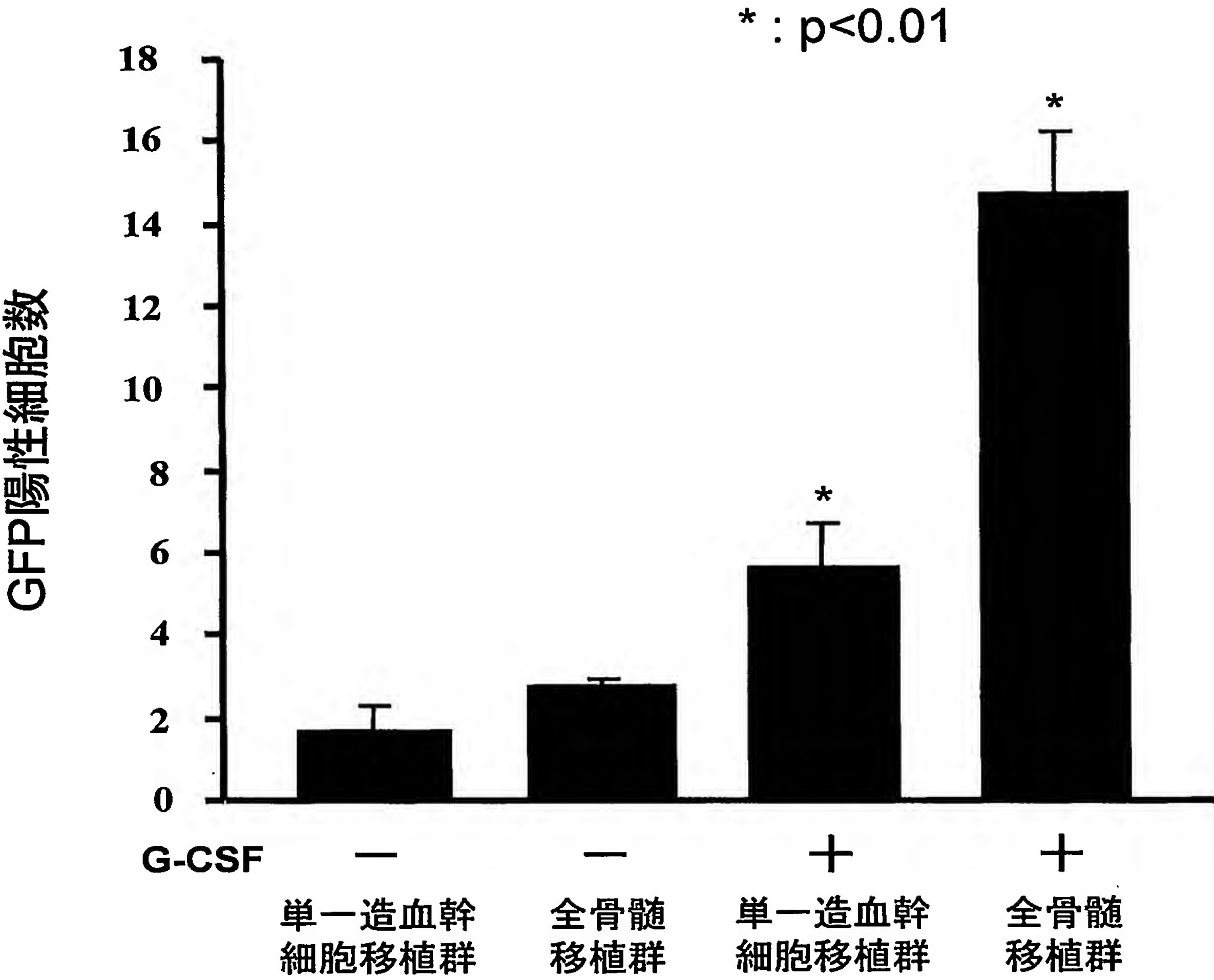


図 20

BEST AVAILABLE COPY



緑: GFP

赤: 抗心筋アクチニン抗体

青: DAPI

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016290

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/19, A61P9/00, 9/10, 17/02, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/19, A61P9/00, 9/10, 17/02, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), JSTPLUS (JOIS),  
JST7580 (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Shinya MINATOBUCHI, Hisayoshi FUJIWARA, "Kotsuzui Saibo Doin ni yoru Shinkin Kosoku Chiryō", Mebio, 2003, Vol.20, No.2, pages 28 to 31, full text	1, 3-8 2, 9
X	WO 02/22163 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 21 March, 2002 (21.03.02), Full text & EP 1327449 A1 & US 2004/0019184 A1	1, 3-8
X	JP 2001-518517 A1 (Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.), 16 October, 2001 (16.10.01), Full text & WO 99/17798 A1 & EP 1019082 A1 & US 2003/0147862 A1	1, 3-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
01 December, 2004 (01.12.04)

Date of mailing of the international search report  
21 December, 2004 (21.12.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016290

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 5-506673 A (Amjen Inc.), 30 September, 1993 (30.09.93), Full text & EP 526630 A1 & US 6689351 B1	2,9
Y	Akihiro UMEZAWA, "Kotsuzuikanshitsu ni yoru Hone Nankotsu Keisei", Experimental Medicine, 2003, Vol.21, No.8, pages 94 to 100, page 94, lower left column	2,9
Y	Frederick Grinnell, Fibroblast, Myofibroblasts, and Wound Contraction, The Journal of Cell Biology, 1994, Vol.124, No.4, pages 401 to 404, full text	2,9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/016290

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10-12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 10 to 12 pertain to a method of mobilizing fibroblasts, a method of engrafting fibroblasts and a method of treating a wound, which are recognized as involving methods for treatment of the human body or therapy, and thus relate to a subject matter which this (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/016290

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/19, A61P9/00, 9/10, 17/02, 43/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/19, A61P9/00, 9/10, 17/02, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN),  
JSTPLUS (JOIS), JST7580 (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	湊口 信也、藤原 久義, 骨髓細胞動員による心筋梗塞治療, Mebio, 2003, Vol.20, No.2, p.28-31, 全文	1, 3-8 2, 9
X	WO 02/22163 A1 (中外製薬株式会社) 2002.3.21., 全文 & EP 1327449 A1 & US 2004/0019184 A1	1, 3-8

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.12.2004

国際調査報告の発送日

21.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 素子

4 P

3436

電話番号 03-3581-1101 内線 3491

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P 2001-518517 A1 (マックス プランク ゲゼルシャフト ツール フェルデルング デル ヴィーセン シャフテン エーファウ) 2001. 10. 16. , 全文 & WO 99/17798 A1 & EP 1019082 A1 & US 2003/0147862 A1	1, 3-8
X	J P 5-506673 A (アムジェン・インコーポレーテッド) 1993. 9. 30. , 全文 & EP 526630 A1 & US 6689351 B1	2, 9
Y	梅澤 明弘, 骨髓間質による骨・軟骨形成, 実験医学, 2003, Vol.21, No.8, p.94-100, 第94頁 左下欄	2, 9
Y	Frederick Grinnell., Fibroblast, Myofibroblasts, and Wound Contraction, The Journal of Cell Biology, 1994, Vol.124, No.4, p.401-404, 全文	2, 9



## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 10-12 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲10-12は、線維芽細胞動員方法、線維芽細胞生着方法、創傷治療方法であるが、該方法には人体の治療方法も包含されると認められるから、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。